S. CĂPÂLNA · D. TĂNĂSESCU · E. TRUȚIA

BIOCHIMIE MEDICALĂ

MINISTERUL EDUCAȚIEI ȘI ÎNVĂȚĂMÎNTULUI

Prof. dr. doc. SIMION CĂPÂLNA, Conf. dr. DINU TĂNĂSESCU,
Conf. dr. EUGEN TRUȚIA

BIOCHIMIE MEDICALĂ

VOL. 1

EDITURA DIDACTICĂ ȘI PEDAGOGICĂ
BUCUREȘTI

Scanned with OKEN Scanner

PREFAȚA

Acest curs este destinat să contribuie la înțelegerea de către studenții în medicină a bazelor moleculare care asigură structura morfologică și funcția organelor și țesuturilor din organismul uman.

Răspunzînd cerințelor de conținut și de întindere ale programei analitice actuale, am urmărit realizarea unei densități maxime de noțiuni renunțînd la orice încărcare cu date istorice, la excesul de formule, mecanisme complicate de reacție etc. Unor aspecte li s-a acordat totuși un spațiu mai larg, comparativ cu acela din manualele mai vechi publicate la noi în țară. Este cazul capitolului de enzime și a biosintezei acizilor nucleici și proteinelor; această extindere este justificată prin achizițiile din ultimii ani în domeniile menționate și, mai ales, pentru utilitatea lor în formarea medicului prezentului și viitorului. De asemenea, apare pentru prima oară la noi în țară, într-un curs de Biochimie Medicală, *un capitol special de autoreglare și control a proceselor moleculare și funcționale, bazat pe acțiunea hormonilor și a altor compuși cu rol de modulatori de reacție.*

Implicațiile biochimiei *în toate specialitățile medicale, în vederea explicării stării normale și patologice, reclamă cunoașterea reacțiilor moleculare din ciclurile stereotipe ale metabolismului intermediar care se desfășoară în toate celulele din organism. În acest sens autorii vor fi recunoscători în primul rînd specialiștilor în științele medicale, dar și altor specialiști din domeniile biologice conexe pentru sugestiile și observațiile lor privind structura și conținutul acestui curs.*

AUTORII

Scanned with OKEN Scanner

CUPRINS

1. Glucide

1.1. Definiţie, clasificare, rol biologic 15
1.2. Monozaharide 16
1.2.1. Structura monozaharidelor 16
1.2.2. Proprietăţile monozaharidelor 23
1.2.3. Reprezentanţii principali ai monozaharidelor 28
1.2.4. Compuşi înrudiţi cu monozaharidele 32
1.3. Oligozaharide 33
1.3.1. Dizaharide reducătoare 33
1.3.2. Dizaharide nereducătoare 35
1.4. Polizaharide 35

2. Lipide 39

2.1. Definiţie, clasificare, rol biologic 39
2.2. Structura şi proprietăţile principalilor componenţi ai lipidelor 40
2.2.1. Acizii graşi 40
2.2.2. Alţi componenţi constitutivi ai lipidelor 44
2.3. Lipide simple 44
2.3.1. Gliceridele 44
2.3.2. Ceridele 45
2.4. Lipidele complexe — Fosfolipidele 46
2.4.1. Glicerofosfolipidele 46
2.4.2. Sfingofosfolipidele şi sfingolipidele 49
2.4.3. Rolul biologic general al fosfolipidelor 51
2.5. Steridele 52

3. Proteine şi heteroproteine 55

3.1. Definiţie, clasificare, rol biologic 55
3.2. Aminoacizii 57
3.2.1. Structura aminoacizilor 57
3.2.2. Proprietăţile fizico-chimice principale ale aminoacizilor 58
3.2.3. Clasificarea aminoacizilor identificaţi în proteine 61
3.2.4. Aminoacizi care nu intră în structura proteinelor 65
3.3. Peptidele 66
3.3.1. Dipeptide 67

Scanned with OKEN Scanner

3.3.2. Tripeptide 67
3.3.3. Polipeptide cu activitate biologică 68
3.4. Proteinele 69
3.4.1. Structura proteinelor fibrilare şi globulare 69
3.4.2. Proprietăţi fizico-chimice ale proteinelor 77
3.4.3. Proteinele plasmatice 79
3.5. Heteroproteinele 80
3.5.1. Cromoproteinele 80
3.5.2. Glicoproteinele şi mucopolizaharidele 94
3.5.3. Nucleoproteinele 97

4. Vitamine şi coenzime 110

4.1. Vitamine liposolubile 111
4.1.1. Vitaminele A 111
4.1.2. Vitaminele D (calciferolii) 112
4.1.3. Vitaminele E (tocoferolii) 113
4.1.4. Vitaminele K 114
4.2. Vitaminele hidrosolubile 114

5. Enzimele 118

5.1. Structura enzimelor 120
5.2. Noţiuni de cinetică enzimatică 121
5.2.1. Influenţa concentraţiei substratului 122
5.2.2. Influenţa concentraţiei enzimei 126
5.2.3. Efectul *p*H-ului 128
5.2.4. Efectul temperaturii 129
5.2.5. Prezenţa activatorilor şi inhibitorilor 132
5.2.6. Alosteria în controlul activităţii enzimatice 136
5.3. Clasificarea şi nomenclatura enzimelor 137
5.4. Descrierea principalelor clase de enzime 137
5.4.1. Oxidoreductazele 157
5.4.2. Transferazele 167
5.4.3. Hidrolazele 177
5.4.4. Liazele 180
5.4.5. Izomerazele 182
5.4.6. Ligazele 186
5.5. Enzimele plasmatice 188
5.5.1. Izoenzimele 192

6. Introducere în metabolismul intermediar 192

6.1. Celula 192
6.1.1. Forma şi dimensiunile celulelor 193
6.1.2. Compoziţia chimică a celulelor 194
6.1.3. Ultrastructura citoplasmei 196
6.1.4. Organitele celulare. Structura şi funcţia lor 200
6.1.5. Membrana celulară şi transportul activ prin membrană 203
6.2. Producerea, stocarea şi utilizarea energiei în celule 203
6.2.1. Noţiuni de termodinamică chimică 205
6.2.2. Ribonucleotidtrifosfaţii în calitate de compuşi macroergici 8

Scanned with OKEN Scanner

6.2.3. Alți compuși macroergici 207
6.2.4. Poziția centrală a ATP între compușii macroergici 208

7. Metabolismul glucidic 210

7.1. Digestia și absorbția glucidelor 211
7.2. Glicoliza 214
7.3. Glicogenoliza 222
7.4. Calea pentozofosfaților 226
7.5. Oxidarea piruvatului 231
7.5.1. Ciclul acizilor tricarboxilici (ciclul K r e b s) 231
7.5.2. Lanțul transportorilor de hidrogen și electroni. Fosforilarea oxidativă . . 238
7.6. Sinteza glicogenului 242
7.7. Ciclul acizilor uronici 243
7.8. Gluconeogeneza 244
7.9. Reglarea metabolismului glucidic 246
7.9.1. Reglarea glicogenolizei și glicogenogenezei 247
7.9.2. Reglarea glicolizei 248
7.9.3. Reglarea gluconeogenezei 250

8. Metabolismul lipidic 251

8.1. Metabolismul trigliceridelor 254
8.1.1. Catabolismul trigliceridelor 254
8.1.2. Anabolismul trigliceridelor 261
8.2. Metabolismul fosfolipidelor 268
8.2.1. Metabolismul fosfoglicerolipidelor 268
8.2.2. Metabolismul fosfosfingolipidelor 274
8.3. Metabolismul corpilor cetonici 276
8.4. Metabolismul colesterolului 279
8.5. Reglarea metabolismului lipidic 282

9. Metabolismul proteic 285

9.1. Digestia proteinelor 286
9.2. Absorbția aminoacizilor 287
9.3. Procese generale de metabolizare a aminoacizilor 287
9.3.1. Transaminarea 288
9.3.2. Decarboxilarea 289
9.3.3. Dezaminarea oxidativă 292
9.3.4. Metabolismul amoniacului 293
9.3.5. Metabolismul glutaminei 293
9.3.6. Ciclul ureogenetic 294
9.4. Metabolismele individuale ale aminoacizilor 297
9.4.1. Metabolismul aminoacizilor neesențiali 297
9.4.2. Metabolismul aminoacizilor esențiali 301
9.5. Metabolismul creatinei 304
9.6. Metabolismul heteroproteinelor 305
9.6.1. Metabolismul cromoproteinelor 305
9.6.2. Metabolismul nucleoproteinelor 318
9.6.3. Biosinteza proteinelor 329

Scanned with OKEN Scanner

10. Sisteme de autocontrol şi reglare. Bioritmuri 337

10.1. Modularea şi reglarea activităţii enzimelor 337
10.2. Reglarea şi controlul molecular-funcţional prin hormoni 339
10.2.1. Modul de acţiune al hormonilor 340
10.2.2. Adrenalina şi noradrenalina 342
10.2.3. Serotonina sau 5-hidroxitriptamina (5-HT) 343
10.2.4. Melatonina sau N-acetil-5-metoxiserotonina 343
10.2.5. Tiroxina 344
10.2.6. Calcitonina 344
10.2.7. Ocitocina 344
10.2.8. Vasopresina 345
10.2.9. Glucagonul 345
10.2.10. Insulina 345
10.2.11. Somatotropina 346
10.2.12. Luteotropina 346
10.2.13. Gonadotrofinele 346
10.2.14. Hormonul tireotrop 347
10.2.15. Hormonul adrenocorticotrop 347
10.2.16. Hormonii gastrointestinali cu structură peptidică 347
10.2.17. Hormonii steroizi 348
10.2.18. Hormonii sexuali 351
10.3. Bioritmurile 353

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

PRESCURTĂRI FOLOSITE ÎN TEXT

Aminoacizi şi peptide

Ala	= alanină
Arg	= arginină
Asp	= acid aspartic
Asp-NH_2	= asparagină
Cys	= cisteină
Cys-S-S-Cys	= cistină
GABA	= acid γ-aminobutiric
Glu	= acid glutamic
Glu-NH_2	= glutamină
Gly	= glicocol
His	= histidină
Ileu	= izoleucină
Leu	= leucină
Lys	= lizină
Met	= metionină
Phe	= fenilalanină
Pro	= prolină
Ser	= serină
Thre	= treonină
Try	= triptofan
Tyr	= tirozină
Val	= valină
G-SH	= glutation (redus)
G-S-S-G	= glutation (oxidat)

Acizi nucleici

A	= adenină
C	= citozină
G	= guanină
T	= timină

U	= uracil
AMP	= acid adenozinmonofosforic (adenilic)
AMP_c	= acid adenozinmonofosforic ciclic
CMP	= acid citidinmonofosforic (citidilic)
GMP	= acid guanozinmonofosforic (guanilic)
GMP_c	= acid guanozinmonofosforic ciclic
UMP	= acid uridinmonofosforic
ADP	= acid adenozindifosforic
CDP	= acid citidindifosforic
GDP	= acid guanozindifosforic
UDP	= acid uridindifosforic
ATP	= acid adenozintrifosforic
CTP	= acid citidintrifosforic
GTP	= acid guanozintrifosforic
UTP	= acid uridintrifosforic
ARN	= acid ribonucleic
ARN_m	= acid ribonucleic mesager
ARN_r	= acid ribonucleic ribozomal
ARN_t (ARN_s)	= acid ribonucleic de transfer (solubil)
ARN_t^{Ala}	= acid ribonucleic de transfer pt. alanină
ADN	= acid dezoxiribonucleic
AIR	= 5-aminoimidazolribonucleotid
GAR	= glicinamidribonucleotid
FGAR	= formilglicinamidribonucleotid
PRPP	= 5-fosforibozilpirofosfat
Gd	= acid dimetilguanilic
Gm	= acid metilguanilic
Im	= acid metilinozinic
Uh	= acid dihidrouridilic
Ψ	= acid pseudouridilic

Hormoni

ACTH	= hormon adrenocorticotrop
FSH	= hormon foliculostimulant
LTH	= hormon luteinizant
STH	= hormon somatotrop
TSH	= hormon tireotrop

Enzime — coenzime

E	= enzimă
ADH	= aldehiddehidrogenază
Clt (Clt.c)	= citocrom
CPK	= creatinfosfokinază
GOT	= glutamicoxalacetictransaminază
GPT	= glutamicpiruvictransaminază
LDH	= lacticdehidrogenază
PFK	= fosfofructokinază
CoA-SH, CoA	= coenzimă A
$FAD(H_2)$	= flavinadenindinucleotid (redus)
NAD(P)+	= nicotinamidadenindinucleotid (fosfat) (oxidat)

Scanned with OKEN Scanner

NAD(P)H	= nicotinamidadenindinucleotid (fosfat) (redus)
THFA	= acid tetrahidrofolic
TPP	= tiaminpirofosfat

Glucide

F-1-P	= fructozo-1-fosfat
F-1,6-P	= fructozo-1,6-difosfat
G-1-P	= glucozo-1-fosfat
G-6-P	= glucozo-6-fosfat
PEP	= acid fosfoenolpiruvic

Diverse

Hb	= hemoglobină
CP	= creatinfosfat
P, P_i	= fosfat anorganic, radical fosfat
PP_i	= pirofosfat anorganic
DOPA	= dihidroxifenilalanină
LAHPO	= hidroxiperoxidul acidului linoleic
PTA	= proteină transportoare de acil
SAM	= S-adenozilmetionină

Scanned with OKEN Scanner

1 GLUCIDE

1.1. DEFINIŢIE, CLASIFICARE, ROL BIOLOGIC

Glucidele sînt aldehide sau cetone ale unor alcooli polihidroxilici, respectiv substanţe carbonilice polihidroxilate. Denumirea de glucide se datoreşte faptului că sînt dulci — (glicos = dulce) —, iar aceea de carbohidraţi (hidraţi de carbon) este datorită formulei generale $C_n(H_2O)_m$. În clasificări se întîlneşte curent şi numele de zaharuri.

Împărţirea glucidelor în două mari clase se face în funcţie de produşii care rezultă în urma hidrolizei, prin aceasta înţelegîndu-se procesul de desfacere — cu intervenţia apei — a unei molecule mai complexe, în una sau mai multe unităţi structurale, constitutive. Conform acestui criteriu, substanţele care eliberează numai glucide poartă denumirea de *holozide* (holos = acelaşi), iar cele care pun în libertate pe lîngă glucide una sau mai multe componente neglucidice, denumite aglicon, sînt *heterozide* (heteros = diferit).

Holozide. Din această clasă fac parte *monozaharidele*, *oligozaharidele* (oligo = puţin) şi *polizaharidele* (poli = mult).

Monozaharidele sînt zaharuri simple sau oze, care prin hidroliză nu pot pune în libertate alte substanţe. În funcţie de numărul atomilor de carbon din structura lor se deosebesc : *trioze*, *tetroze*, *pentoze*, *hexoze* etc., iar în funcţie de gruparea carbonilică pe care o conţin se deosebesc *aldoze*, respectiv *cetoze*.

Oligozaharidele eliberează prin hidroliză două pînă la maximum zece monozaharide. Din punct de vedere biologic, cele mai importante oligozaharide sînt dizaharidele şi anume : *maltoza*, *lactoza* şi *zaharoza* care pun în libertate, în ordine : două molecule de glucoză, o moleculă de glucoză şi una de galactoză şi, respectiv, o moleculă de glucoză şi una de fructoză.

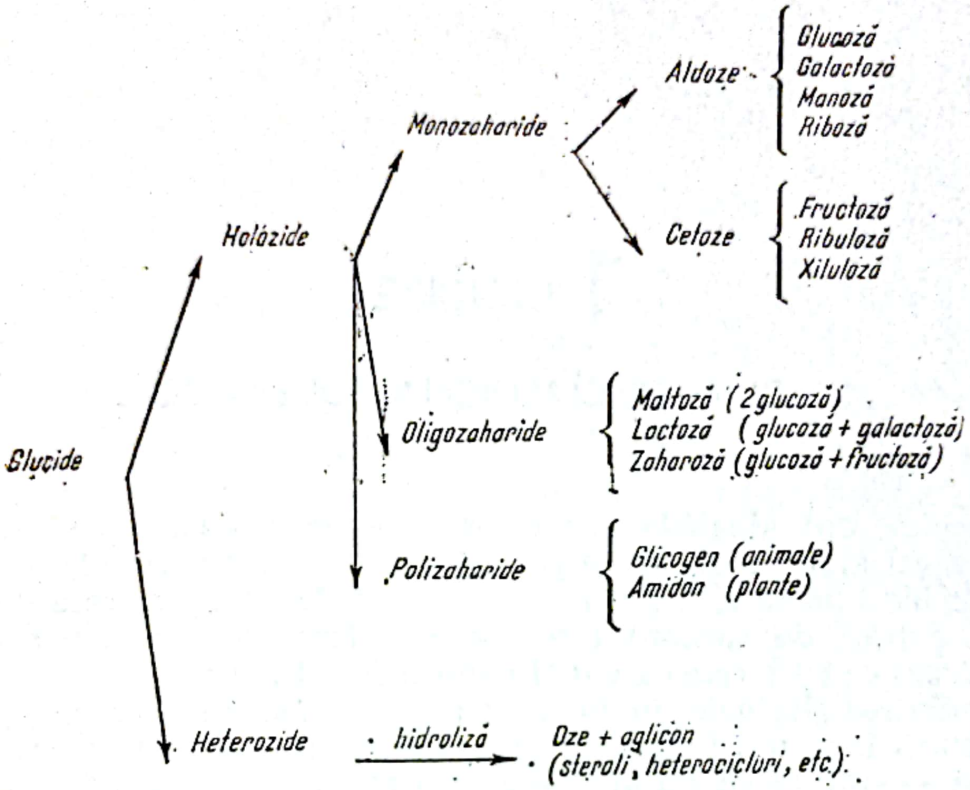
Polizaharidele eliberează prin hidroliză mai mult de zece molecule de oze. Exemple de polizaharide sînt celuloza şi amidonul din plante, precum şi glicogenul din ţesuturile animale.

Heterozide. Acestea formează o clasă de substanţe deosebit de importante din punct de vedere biologic, alcătuite din diferite oze şi agliconi cu structură variată, care poate fi simplă ca în cazul alcoolului

Scanned with OKEN Scanner

metilic, sau mult mai complexă ca, de exemplu, în cazul sterolilor sau a unor substanţe cu structuri heterociclice.

Glucidele constituie o clasă de substanţe cu important rol biologic, ele reprezentînd în primul rînd sursa de bază pentru producerea energiei



necesară desfăşurării proceselor vitale din organism. Energia se obţine prin degradarea glucidelor, mai corect spus a glucozei. Degradarea are loc printr-o succesiune complexă de reacţii biochimice, dintre care unele — fapt deosebit de semnificativ — sînt identice şi în cazul obţinerii energiei pornind de la alte clase de substanţe cu rol energetic : lipidele şi proteinele. Glucidele au de asemenea şi un rol plastic, adică intră în structura unor componente ce alcătuiesc arhitectura complexă a celulelor.

În afara acestor roluri principale glucidele, singure sau în diferite combinaţii, au numeroase alte funcţii biologice.

1.2. MONOZAHARIDE

1.2.1. STRUCTURA MONOZAHARIDELOR

Cu ajutorul metodologiei clasice a chimiei organice s-a stabilit că glucidele au următoarele caracteristici structurale principale comune :

— conţin o catenă neramificată de atomi de carbon; sînt cunoscute cîteva excepţii, dintre care prezintă importanţă din punct de vedere biologic o dialdehidă obţinută prin hidroliza streptomicinei şi denumită streptoză ;

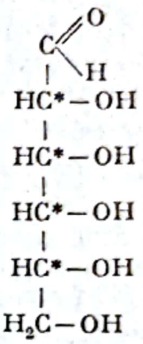
— conţin o grupare carbonilică fie aldehidică, fie cetonică ;

— conţin grupări hidroxil al căror număr este cu unul mai mic decît numărul atomilor de carbon al ozei respective : de exemplu, glucoza,

un monozaharid cu șase atomi de carbon, are cinci grupări hidroxil, cel de al șaselea atom de carbon făcînd parte din gruparea aldehidică.

În decursul timpului, pentru glucide s-au propus diferite formule de structură, urmărindu-se, evident, ca acestea să fie în cît mai bună concordanță cu proprietățile fizico-chimice.

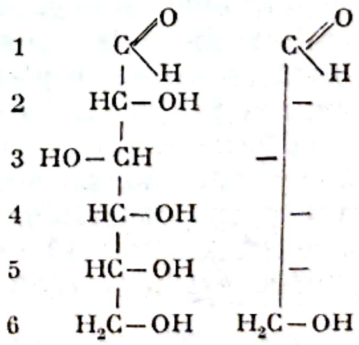
1.2.1.1. *Formularea liniară* a fost prima formulare propusă în care toate grupările hidroxil au fost dispuse de aceeași parte a catenei de atomi de carbon. Această formulare putea explica o serie de proprietăți caracteristice grupării carbonil, ca de exemplu proprietățile reducătoare, formarea oxizilor și a hidrazonelor, precum și unele proprietăți datorate celor cinci grupări hidroxil, cum ar fi formarea derivaților pentaacetilați. Natura neramificată a lanțului de atomi de carbon a fost dovedită prin reducerea glucozei de către acidul iodhidric, cu formare de iodohexan normal.



Aldoza reprezentată alăturat în formulare liniară are patru atomi de carbon asimetrici (notați cu asterisc), ceea ce a făcut să se presupună și existența izomerilor optici (printr-un atom de carbon asimetric se înțelege atomul care posedă toate cele patru valențe satisfăcute cu grupări diferite, excepție făcînd legătura carbon-carbon). Conform relației lui Van't Hoff, o moleculă cu n atomi de carbon asimetrici poate exista sub forma a 2^n izomeri optici, de unde rezultă că vor exista două aldotrioze, patru aldotetroze, opt aldopentoze și 16 aldohexoze. Deci, în afară de glucoză, care este o aldohexoză, mai sînt posibili încă 15 izomeri. Opt dintre izomeri reprezintă așa-numita serie *D*, iar ceilalți opt imaginea lor în oglindă, seria *L*.

Se menționează că cetozele, care au un atom de carbon asimetric mai puțin decît aldozele, vor exista sub forma unei singure cetotrioze, a două cetotetroze, patru cetopentoze și, respectiv, opt cetohexoze.

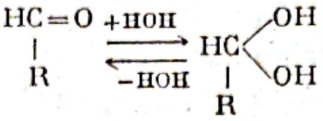
Din cei opt izomeri ai seriei *D* a aldohexozelor, formula liniară a glucozei este cea înfățișată alăturat împreună cu o formulare schematică; ceilalți șapte izomeri optici ai glucozei au grupările hidroxil dispuse în mod diferit, la dreapta sau la stînga catenei de carbon, poziție precizată în mod riguros cu ajutorul unor reacții chimice specifice.

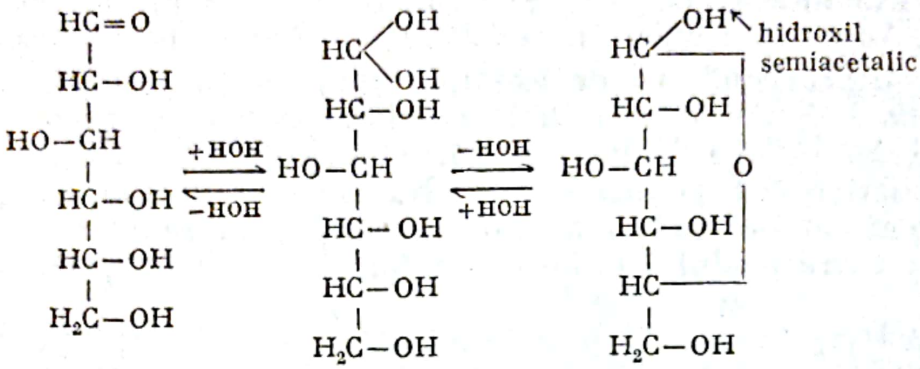


1.2.1.2. *Formularea ciclică* (*semiacetalică*) a fost elaborată de Tollens (1886) ulterior, constatîndu-se că gruparea carbonilică se comportă în anumite condiții ca și cum ar fi „mascată". Această formulare se utilizează în mod curent și astăzi și se obține din cea liniară prin hidratarea grupării carbonil și eliminarea unei molecule de apă între unul din cei doi hidroxili ai grupării carbonil hidratate și un hidroxil de la un atom de carbon mai îndepărtat. Hidratarea grupării carbonil se produce totdeauna cînd acești compuși sînt dizolvați în apă.

În formularea ciclică, hidroxilul de la C_1 are proprietăți net distincte de ale celorlalte grupări de acest fel din moleculă, deoarece păstrează și

unele caracteristici ale grupării carbonil. Acest hidroxil poartă numele de *semiacetalic*, deoarece ozele, deşi aldehide, nu formează acetali propriu-zişi.

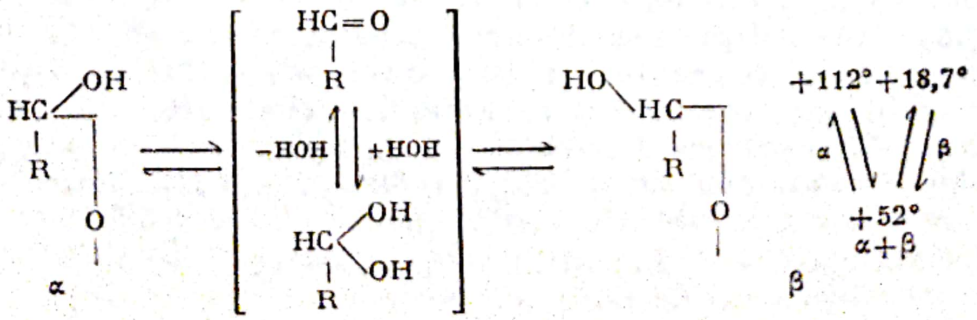




Principalele argumente fizico-chimice care sprijină justeţea formulării ciclice (semiacetalice), astăzi unanim recunoscută, sînt următoarele :

— comportarea ozelor faţă de reactivul Schiff; monozaharidele, deşi conţin în structura lor o grupare carbonil, nu dau o reacţie de mare sensibilitate pentru această grupare şi anume nu recolorează în roşu fuxina decolorată în prealabil cu bioxid de sulf (reactivul Schiff);

— izomeria α/β şi existenţa fenomenului de *mutarotaţie*. În formularea aciclică, aldohexozele se prezintă sub forma a 16 izomeri optici. În formularea ciclică fiecare din aceşti izomeri poate avea încă două forme, o formă α şi una β, datorită faptului că şi C_1 devine asimetric. Fenomenul de mutarotaţie constă în faptul că soluţia proaspăt preparată de α-*D*-glucoză roteşte planul luminii polarizate cu un unghi de +112° numai un timp scurt, după care rotaţia scade treptat şi se opreşte la +52°. Această modificare a unghiului de rotaţie a planului luminii polarizate se explică astfel : în mod obişnuit glucoza se găseşte în forma α (înţelegînd prin aceasta că hidroxilul semiacetalic este orientat de aceeaşi parte cu puntea semiacetalică), formă care roteşte planul luminii polarizate cu +112°; în timp, are loc trecerea parţială a formei α în β, obţinîndu-se în final un echilibru al celor două forme pentru care unghiul de rotaţie este de 52°. Făcîndu-se aceleaşi determinări, dar plecînd de la forma β, care se obţine cu multă greutate în stare pură, planul luminii polarizate este iniţial rotit cu un unghi de +18,7°, ca după un timp să se stabilizeze tot la +52°. Înseamnă că în soluţie glucoza există în ambele forme, echilibrul avînd loc în felul următor:



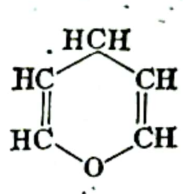
Din mecanismul prezentat reiese că, în anumite condiţii, în soluţie coexistă atît forma ciclică cu cei doi izomeri α şi β aflaţi în echilibru, cît şi forma liniară cu gruparea carbonil liberă, ceea ce explică o serie de reacţii specifice. Trebuie notat însă faptul că în soluţie apoasă glucoza — ca de altfel toate monozaharidele — se găseşte numai într-o proporţie de 0,0026% cu gruparea carbonil liberă, 99,9974% fiind sub formă semiacetalică, ciclică.

Izomerii α şi β, care au funcţii biologice diferite, se numesc *forme anomere*, fenomenul de mutarotaţie purtînd şi denumirea de *anomerie*, iar atomul de carbon C_1 este un carbon anomeric.

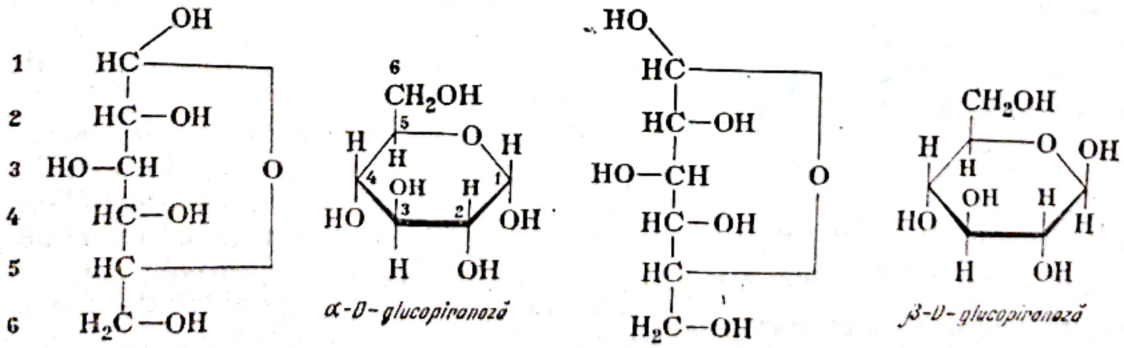
1.2.1.3. *Formularea perspectivică* a fost propusă de Haworth (1921), fiind apoi la scurt timp confirmată experimental şi acceptată. Aceasta deoarece formularea ciclică, semiacetalică, preconizată de Tollens şi confirmată ulterior de mulţi alţi cercetători, nu redă corect poziţia pe care o ocupă în spaţiu atomii de carbon, respectiv de oxigen, ai glucozei sau ai celorlalte monozaharide.

Analizînd formularea semiacetalică propusă de Tollens şi ţinînd seama de valoarea normală a unghiului dintre valenţele carbonului pot lua naştere cicluri de 5 sau 6 atomi, dintre care unul este de oxigen. Ciclurile de 6 atomi sînt denumite *piranozice* (de la piran), iar cele cu 5 atomi *furanozice* (de la furan).

Monozaharidele care formează un ciclu de 6 atomi sînt în general aldohexozele, iar cetohexozele şi aldopentozele formează cicluri de 5 atomi. Această preferinţă a aldohexozelor şi a cetohexozelor de a forma cicluri piranozice, respectiv furanozice se datoreşte tendinţei acestora de a avea cele mai mici tensiuni energetice.



piran

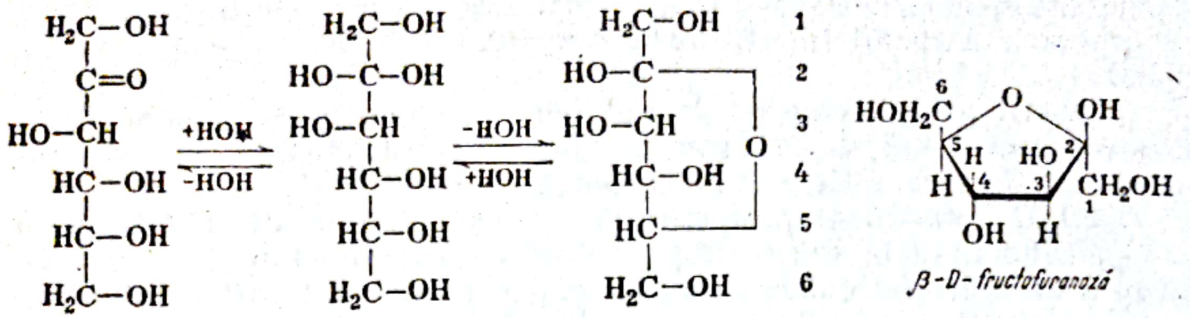


α-D-glucopiranoză *β-D-glucopiranoză*

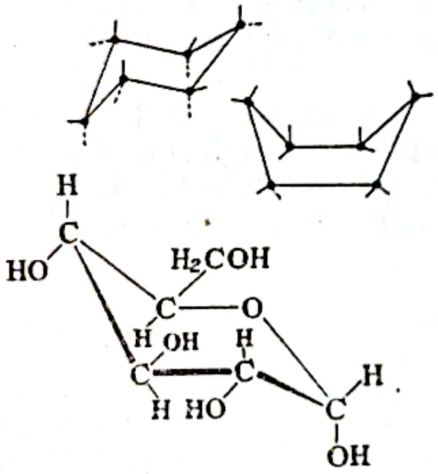
Haworth a reprezentat ciclurile piranozice şi furanozice dispuse perpendicular pe planul hîrtiei, atomii de hidrogen şi grupările hidroxil fiind orientate deasupra şi dedesubtul acestui plan. Trebuie reţinut faptul că hidroxilul semiacetalic al izomerului α se va găsi întotdeauna dedesubtul acestui plan, în timp ce hidroxilul din poziţia β va fi deasupra.

Scanned with OKEN Scanner

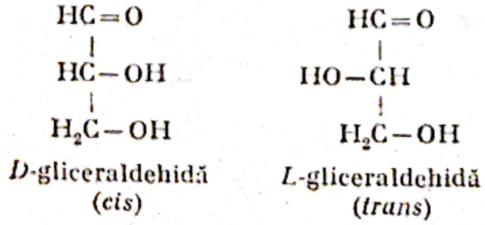
În ceea ce privește fructoza, un monozaharid de o deosebită importanță, care are o structură ciclică formată din 5 atomi (deci furanozică), izomerii α și β sînt :

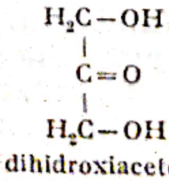


1.2.1.4. *Formularea spațială* a fost adoptată deoarece ulterior s-a constatat că nici formularea perspectivică nu corespunde întru totul realității. Ca și în cazul ciclohexanului, cei șase atomi care formează un ciclu piranozic pot avea două configurații, așa-numitele *forme scaun* și *baie*, formulări ce redau mai exact poziția reală în spațiu a celor 6 atomi. Dintre cele două forme, în cazul monozaharidelor forma cea mai stabilă este forma scaun. Formulele monozaharidelor se scriu însă în mod curent, din comoditate, liniar, ciclic sau perspectivic, în funcție de proprietățile care urmează a fi scoase în evidență.



1.2.1.5. *Seriile D și L ale monozaharidelor*, ca și a altor clase de compuși (de exemplu aminoacizii), sînt determinate de carbonii asimetrici, care produc un tip special de izomerie, notată prin *D* și *L*. Practic toate monozaharidele utilizate de organismul uman aparțin seriei *D*. Aceasta, deoarece atît enzimele de degradare, care catabolizează ozele, cît și cele care le sintetizează, datorită unor specificități riguroase de acțiune, nu recunosc decît membrii seriei *D* ; numai o cantitate infimă de oze din seria *L* sînt utilizate de către mamifere.



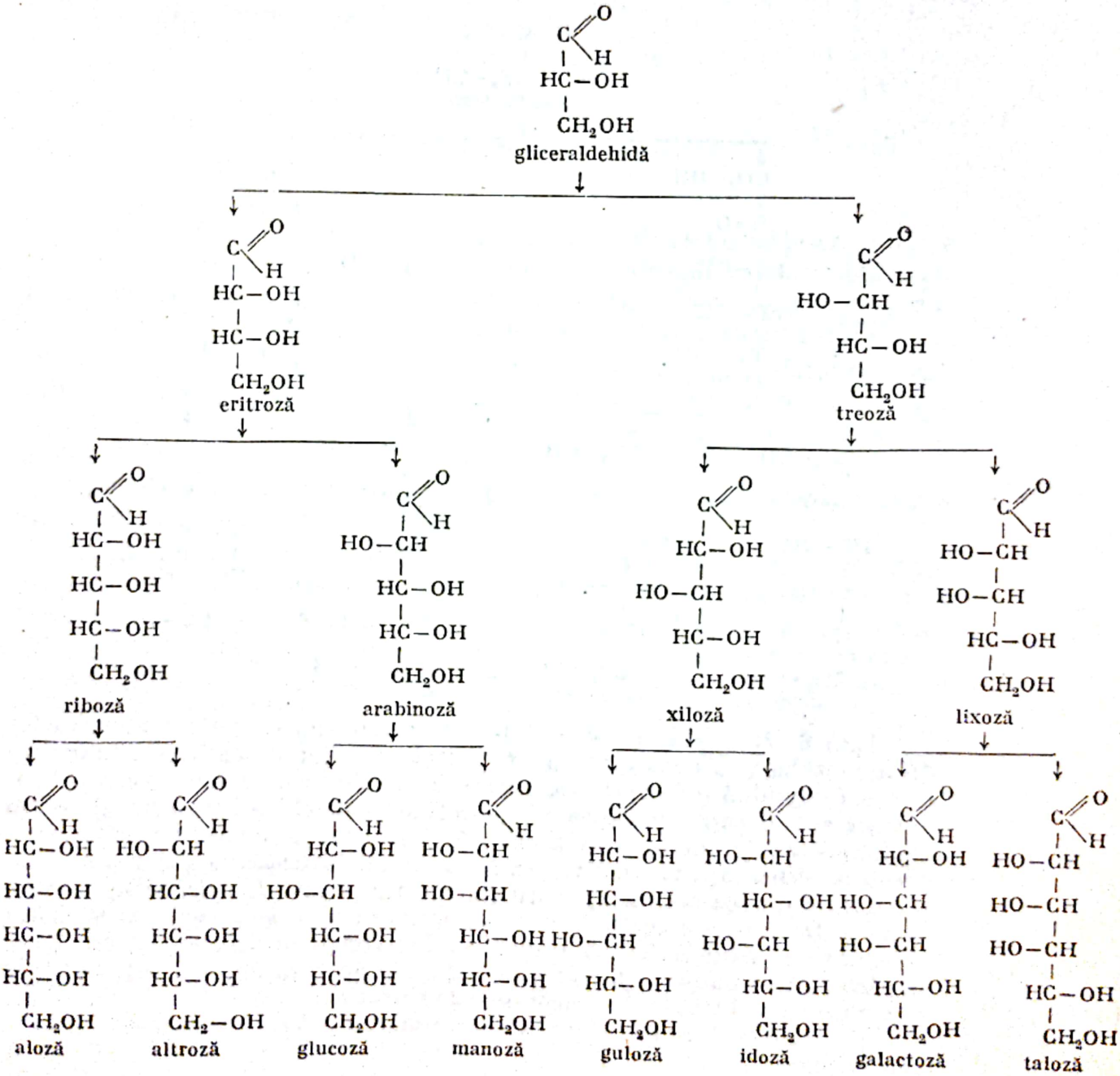


Dar cum se precizează teoretic apartenența unei oze la seria *D* sau la seria *L*? Aceasta se face în funcție de relația spațială față de o substanță de referință, parentală, din clasa respectivă, care în cazul aldozelor este gliceraldehida, iar în cazul cetozelor dihidroxiacetona.

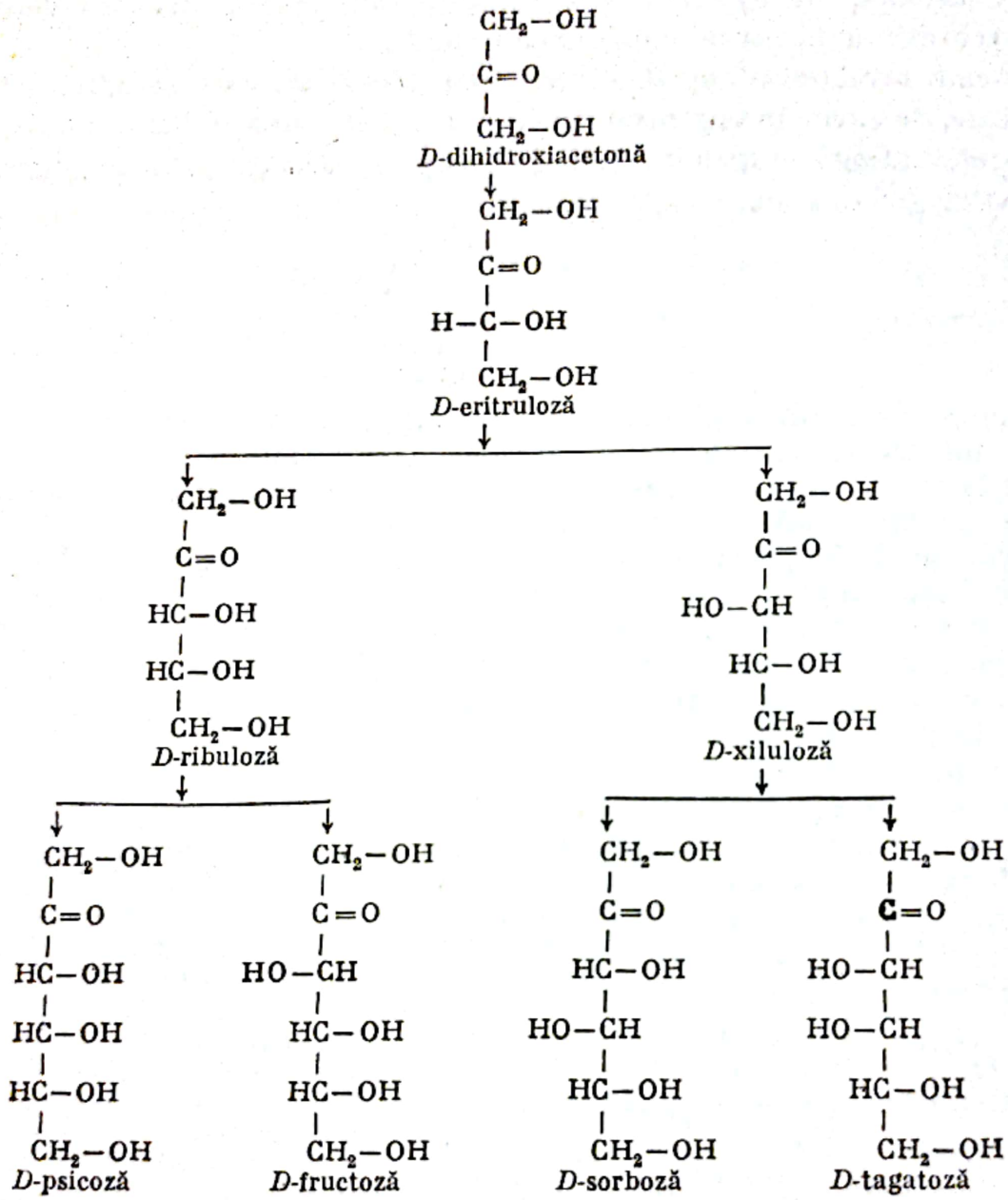
Se observă că gliceraldehida poate exista sub formă de izomer *D* sau *L*, în funcție de poziția pe care o ocupă hidroxilul alcoolic secundar, de la atomul C_2. Dacă o oză oarecare are hidroxilul alcoolic secundar alăturat celui primar (în ca-

zul hexozelor hidroxilul de la C_5), în partea dreaptă a lanțului atomilor de carbon, atunci oza respectivă aparține seriei *D*. Poziția celorlalți hidroxili alcoolici nu are nici o importanță din acest punct de vedere. Seria *L* reprezintă imaginea în oglindă a seriei *D*.

Schema următoare cuprinde seria *D* a aldozelor, care se oprește la aldohexoze, deoarece în organismul uman nu se întîlnesc aldoze cu număr mai mare de atomi de carbon. Ozele importante pentru organismul uman sînt riboza, glucoza, manoza, galactoza.



În continuare este redată seria *D* a cetozelor, cele mai importante dintre acestea fiind dihidroxiacetona, ribuloza şi fructoza.



1.2.1.6. *Izomeria optică* se datoreşte asimetriei spaţiale a moleculelor de monozaharide, consecinţă a existenţei atomilor de carbon asimetrici: o rază de lumină polarizată care trece prin soluţia unei oze oarecare va fi deviată spre dreapta sau spre stînga în funcţie de efectul final dat de suma algebrică a acţiunii fiecărui atom asimetric. Dacă devierea are loc spre dreapta, substanţa respectivă este denumită *dextrogiră* şi se notează cu semnul (+), dacă are loc spre stînga, substanţa este *levogiră* şi se notează cu (—). O proporţie egală de izomeri optici dextro- şi levogiri ai aceleiaşi substanţe se caracterizează prin lipsa activităţii optice, amestecul celor doi izomeri se numeşte *formă racemică* şi se notează cu (+, —). Formele racemice sînt obţinute de obicei pe cale sintetică.

Formele dextro- şi levogire se mai numesc şi *forme enantiomere* (enantios = invers).

Scanned with OKEN Scanner

1.2.1.7. *Notaţia monozaharidelor* are drept scop precizarea naturii celor două tipuri de izomeri : în faţa numelui ozei respective se introduc literele *D*- sau *L*- pentru precizarea apartenenţei la una din cele două serii, iar în paranteză se notează sensul în care rotesc planul luminii polarizate, (+) sau (—). Pentru ozele care prezintă anomeri, aceştia se notează cu α şi β. De exemplu, glucoza din seria *D*, dextrogiră, şi care are hidroxilul semiacetalic în α va fi notată corect în felul următor : α-*D*,(+), -glucoză.

Pentru simplificare, în scrierea curentă a formulelor ciclice, se indică prin linii poziţia grupărilor — OH la atomii de carbon, fără a se mai indica poziţia hidrogenilor.

1.2.2. PROPRIETĂŢILE MONOZAHARIDELOR

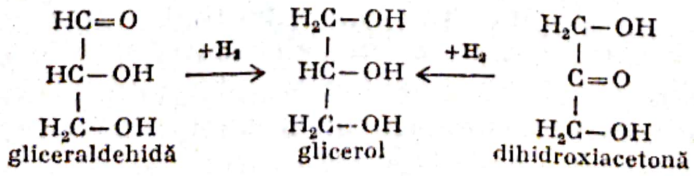
1.2.2.1. *Proprietăţile fizice* : monozaharidele sînt substanţe cristalizate, incolore şi care, datorită numeroaselor grupări hidroxilice din structura lor, sînt uşor solubile în apă, la concentraţii ridicate formînd siropuri. Sînt greu solubile în alcool şi insolubile în eter şi cloroform. Au gust dulce.

1.2.2.2. *Proprietăţile chimice* ale monozaharidelor se datorează atît existenţei grupării carbonilice, cît şi hidroxililor alcoolici secundari şi a celui primar. S-au selecţionat acele proprietăţi care prezintă interes din punct de vedere biologic, şi mai ales medical.

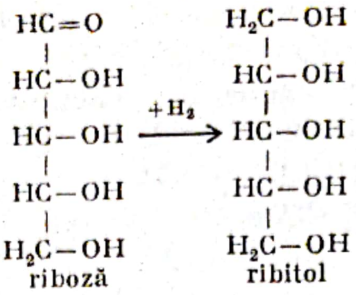
1.2.2.2.1. *Proprietăţile datorate grupării carbonilice* aseamănă monozaharidele cu aldehidele sau cetonele.

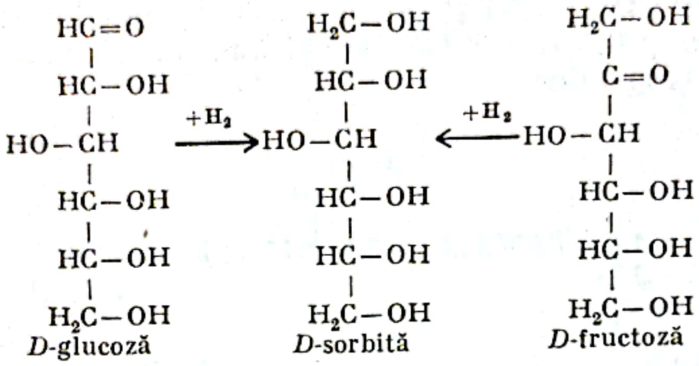
Reducerea. Gruparea carbonil a ozelor poate fi transformată într-o grupare hidroxil printr-un proces care poate avea loc *in vitro*, deci în laborator, dar şi *in vivo*, adică în organism. În primul caz reducerea are loc sub acţiunea amalgamului de sodiu sau a hidrogenului activat. În al doilea caz, reducerea grupării carbonil se realizează cu ajutorul hidrogenului cedat de către o enzimă NADPH — dependentă (v. „Enzime").

În urma acestor procese se formează polioli şi anume, din tetroze se formează tetrite, din pentoze, pentite, iar din hexoze, hexite. Din gliceraldehidă sau dihidroxiacetonă se formează glicerol. Glicerolul are o mare importanţă deoarece, prin esterificarea sa cu trei molecule de acizi graşi, au naştere trigliceridele, lipidele de rezervă ale organismului :



Scanned with OKEN Scanner





Din eritroză se formează eritrita, singura tetrită care se găsește în natură. A fost identificată în alge, ciuperci și licheni, importanța ei pentru om fiind limitată.

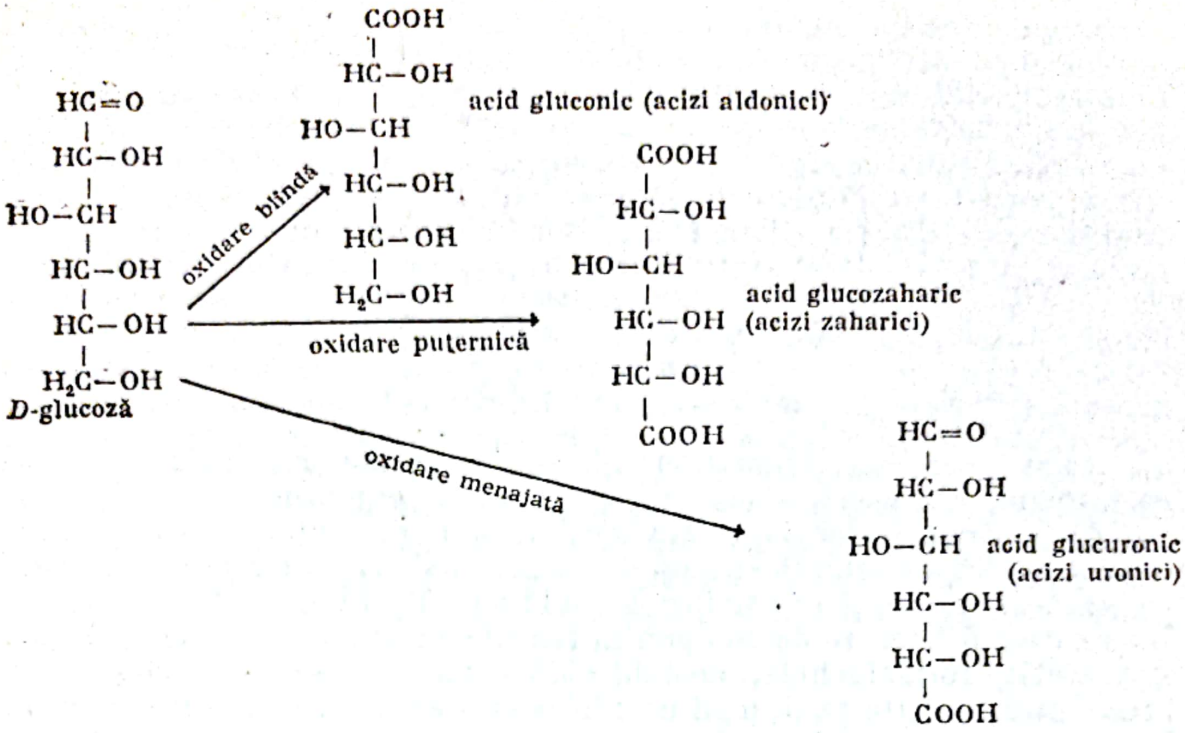
Prin hidrogenarea pentozelor se formează pentite, cele mai de seamă din ele fiind ribita (sau ribitolul), poliol ce se formează din riboză și care se întîlnește în structura vitaminei B_2, și xilitolul, ce se formează dintr-o cetoză, xiluloza. Xilitolul se găsește într-o cantitate limitată în organism, dar în ultimul timp i se atribuie o importanță terapeutică din ce în ce mai mare.

Cele mai importante hexite din punct de vedere biologic sînt : manita sau manitolul, care poate lua naștere din manoză și fructoză și care se găsește în mană și în alge, sorbita, care rezultă din hidrogenarea fructozei (alături de manită) sau a glucozei și care se găsește în fructe și constituie o substanță de plecare în sinteza vitaminei C și, în sfîrșit, dulcita, formată din galactoză și care are utilizări în bacteriologie.

Oxidarea. Produșii care iau naștere prin oxidarea monozaharidelor diferă prin gradul de oxidare a grupării carbonilice și a alcoolului primar.

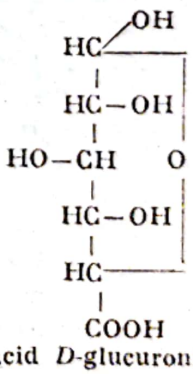
a. *Oxidarea blîndă* se produce *in vitro*, cu apă de brom, apă de clor, HNO_3 la rece într-un mediu carbonatat, iar *in vivo*, sub acțiunea unor enzime specifice ; gruparea carbonil se transformă într-o grupare carboxil, dînd naștere hidroxiacizilor monobazici, care poartă denumirea generică de *acizi aldonici* (*acizi onici*). Din galactoză se formează acid galactonic, iar din glucoză acid gluconic. Cel mai important dintre acizii onici este acidul gluconic a cărui sare de calciu, gluconatul de calciu, reprezintă o formă asimilabilă a calciului. Acidul 6-fosfogluconic este un compus intermediar, care se formează în cursul unor etape din metabolismul glucidic.

Scanned with OKEN Scanner

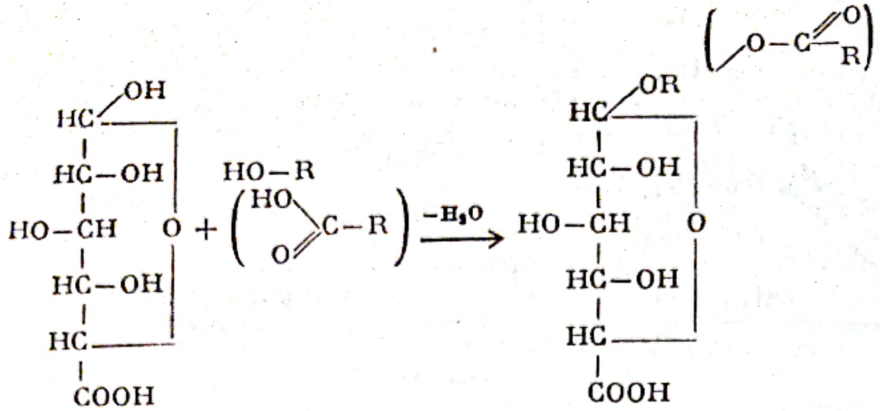


b. *Oxidarea energică*, cînd se oxidează atît gruparea carbonil de la C_1, cît şi hidroxilul alcoolic primar de la atomul C_6, dînd naştere *acizilor zaharici* (*acizi arici*). Din glucoză se formează acidul zaharic (glucozaharic sau glucaric), din galactoză — acidul mucic (galactozaharic sau galactaric). Acizii zaharici, care se găsesc în fructe şi în plante, au o mai mică importanţă pentru om.

c. *Oxidarea menajată* a aldohexozelor: după protejarea grupării carbonil se oxidează numai hidroxilul alcoolic primar de la atomul C_6, rezultînd *acizii uronici*, şi anume acizii glucuronic, manuronic, galacturonic. Aceşti acizi uronici sînt de o deosebită importanţă pentru organism, deoarece au un rol hotărîtor atît în procesele de detoxifiere care au loc în ficat, cît şi un rol plastic, intrînd în compoziţia unor substanţe cu masă moleculară relativă mare, biomoleculele, ca poliuronidele (polizaharide de origine vegetală) sau ca mucopolizaharidele, de origine vegetală şi animală. Principalul rol de detoxifiere îl are acidul glucuronic, care se combină în ficat cu diverse substanţe exogene toxice, introduse oral, diverşi fenoli sau diferiţi metaboliţi, substanţe formate endogen, ca bilirubina sau substanţe biologic active, hormoni cu structură sterolică de pildă. Legarea acidului glucuronic cu substanţele cărora le neutralizează efectul toxic sau le solubilizează, ajutînd la eliminarea lor prin urină, are loc între hidroxilul semiacetalic al acidului glucuronic şi hidroxilul sau gruparea carboxilică a substanţelor respective:



acid *D*-glucuronic

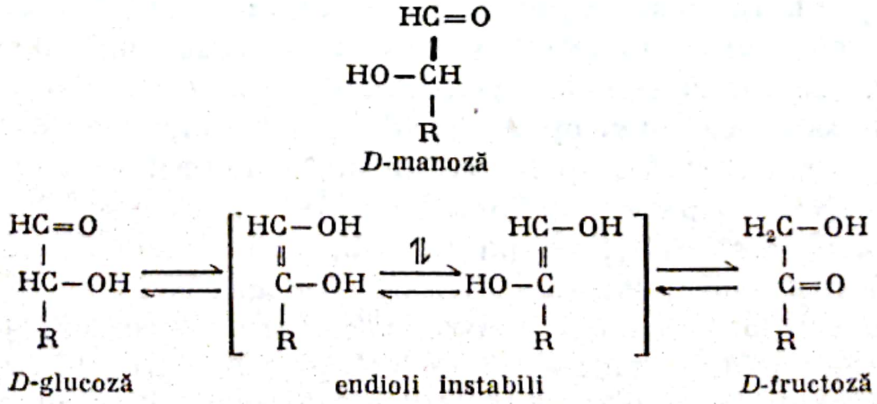


Acizii glucuronic şi galacturonic din structura mucopolizaharidelor au o origine endogenă, adică sînt sintetizaţi în organism.

d. *Oxidarea ozelor în mediu alcalin* şi în prezenţa ionilor de Ag^{+}, Cu^{2+} sau Bi^{3+}, determină aşa-numita putere reducătoare a monozaharidelor. Ozele, în prezenţa reactivilor Fehling, Tollens, Nylander, Bertrand etc., se descompun în felurite substanţe — ca acizii formic sau acetic, formaldehidă, acetaldehidă — formîndu-se în acelaşi timp precipitate care atestă în mod neîndoios existenţa ozelor în diverse medii biologice.

ACŢIUNEA BAZELOR

a. *Bazele slabe* determină un proces de izomerizare, de *epimerizare*. Dacă se dizolvă într-un mediu slab alcalin una din următoarele oze: glucoză, manoză sau fructoză, după o anumită perioadă de timp se constată prezenţa unui amestec de oze în următoarea proporţie: 63% *D*-glucoză, 6% *D*-manoză şi 31% *D*-fructoză. A avut prin urmare loc un proces de izomerizare, care se poate explica prin posibilitatea de interconversiune a celor trei monozaharide, care diferă între ele numai prin configuraţia unui singur atom de carbon C_2. Ozele menţionate mai sus sînt *epimere*, iar fenomenul de interconversiune se numeşte epimerizare. Acest proces, care are loc probabil prin formarea unui compus intermediar instabil — un endiol, se petrece şi în organism, la nivelul ficatului, fiind catalizat de enzime specifice, şi are o importanţă biochimică dintre cele mai mari:



D-manoză

D-glucoză — endioli instabili — *D*-fructoză

b. *Bazele tari* determină o scindare neuniformă a moleculei de monozaharid, cu formare de acid lactic, aldehidă formică, dihidroxiacetonă etc.

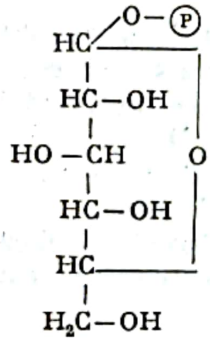
Scanned with OKEN Scanner

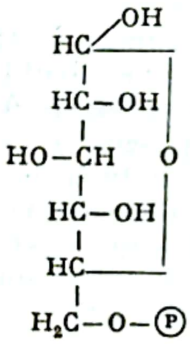
În prezența acestor baze tari și la cald, în urma unor procese de polimerizare, se depun rășini de culoare brună. Procesele acestea nu au valoare biologică.

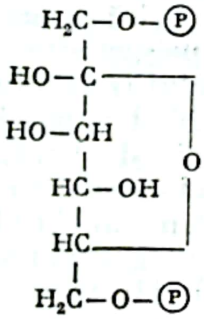
Acțiunea acizilor. În prezența acizilor sulfuric și clorhidric, la cald, se produce o deshidratare însoțită de ciclizare a ozelor, formîndu-se din aldopentoze furfural, iar din aldohexoze hidroximetilfurfural. Prin condensarea furfuralului sau a hidroximetilfurfuralului cu fluoroglucina, orcina, rezorcina, antrona etc., iau naștere complecși colorați, care permit identificarea acestor compuși, cu diferențiere între aldoze și cetoze, pentoze și hexoze și chiar dozarea cantitativă a lor.

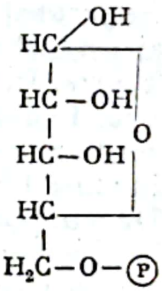
1.2.2.2.2. *Proprietățile datorate grupărilor hidroxil* aseamănă monozaharidele alcoolilor primari sau secundari.

Formarea de esteri. Esterii fosforici sînt cei mai importanți din punct de vedere biologic. Ei se formează între monozaharide și acidul ortofosforic, esterificarea avînd loc fie la hidroxilul semiacetalic, fie la cel alcoolic primar, în urma unor reacții catalizate de enzime specifice. Esterii fosforici ai monozaharidelor reprezintă forma de metabolizare a acestora; ozele neesterificate, libere, se găsesc numai în cantități limitate în țesuturi sau organe. O excepție o constituie sîngele, unde ozele libere reprezintă marea majoritate.


glucozo-1-fosfat

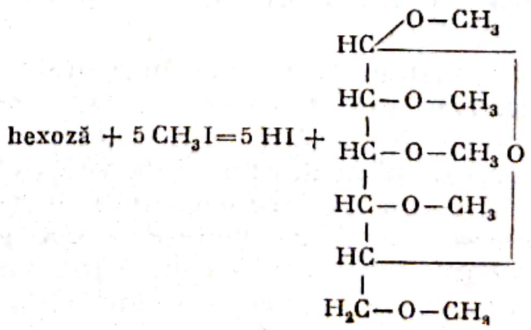

glucozo-6-fosfat


fructozo-1,6-difosfat


ribozo-5-fosfat

Esterii acetici și cei borici au fost utilizați la determinarea structurii monozaharidelor, putîndu-se preciza poziția față de catena de carbon a hidroxililor alcoolici secundari, precum și aceea a hidroxilului semiacetalic, esterii acetici neavînd, în acest caz, aceeași stabilitate.

Formarea de eteri. Sub acțiunea iodurii de metil au putut fi substituiți hidroxilii alcoolici liberi, prezentîndu-se cu cea mai mare exactitate poziția punții semiacetalice.



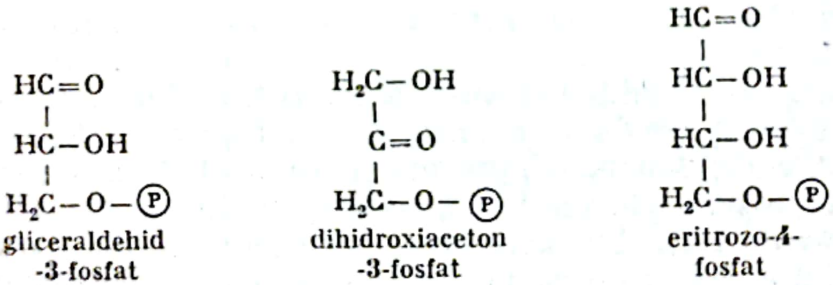
Izomerii monozaharidelor naturale. Organismele animale, ca și cele vegetale dealtfel, au anumite trăsături specifice care definesc, care determină în ultimă instanță viața. În decursul lungii perioade de evoluție a formelor vii s-a ajuns la un rafinament care se apropie de perfecțiune, selecționîndu-se și păstrîndu-se cea mai simplă variantă, care este, în același timp, și cea mai indicată pentru ansamblul de procese ce caracterizează viața. Astfel, cei mai mulți constituenți ai organismelor au structuri relativ simple, ciclice sau aciclice. Evident că nu se iau aici în discuție complexele edificii moleculare pe care le reprezintă biomoleculele, ci numai unitățile structurale ale acestora, precum și a numeroaselor substanțe organice identificate în organisme și care au, toate, un rol bine determinat.

Prin urmare, din numeroasa familie a substanțelor organice s-au selecționat un număr relativ redus, selecția fiind deci foarte severă; amintim, spre exemplificare, faptul că din cei 16 izomeri posibili ai aldohexozelor numai 3 sînt utilizați de organismul uman, și anume *D*-glucoza, *D*-manoza și *D*-galactoza. Și aceasta în contextul unor asemănări structurale remarcabile, deosebirea constînd doar în poziția diferită a unui singur hidroxil alcoolic.

Importanța biologică a acestei asimetrii structurale a substanțelor organice a fost pusă pentru prima dată în evidență de P a s t e u r.

Trioze. Principalul trizaharid este *gliceraldehida* care, pe lîngă importanța lui teoretică, fiind punctul de plecare al seriilor *D* și *L*, este și un intermediar metabolic de bază, formîndu-se continuu în organism, nu însă în stare liberă, ci ca ester fosforic (3-fosfogliceraldehidă).

De o importanță metabolică la fel de mare este și cetoza cu trei carboni, *dihidroxiacetona*, și ea găsindu-se în organism numai sub forma esterului fosforic, și anume dihidroxiaceton-3-fosfatul :



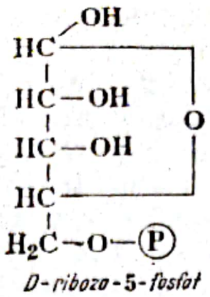
Tetroze. *Eritrozo-4-fosfatul* este singurul reprezentant al acestora cu importanță metabolică și care se formează pe așa-numita cale a pentozofosfaților.

Pentozele. Sînt larg răspîndite mai ales în regnul vegetal, unde intră în structura unor polizaharide formate numai din pentoze, numite pentozani, biopolimeri cu o valoare alimentară mică pentru om.

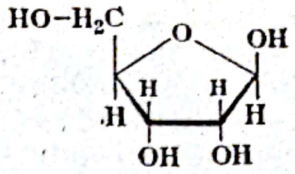
Principalul lor reprezentant, din punct de vedere biologic, este *riboza*, care se sintetizează în toate organismele, animale și vegetale, pe calea pentozofosfaților. Riboza are un rol metabolic mai redus, dar marea ei importanță biologică constă în faptul că intră în structura unor compuși cum ar fi : ARN, cu un rol în sinteza proteinelor, ATP, care reprezintă

Scanned with OKEN Scanner

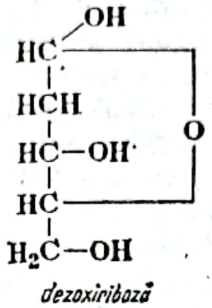
compusul sub forma căruia este înmagazinată energia în sistemele vii, NAD^+, unul din principalii transportori enzimatici de hidrogen etc. În organism este întîlnită numai sub forma esterului 5-fosforic. În structura ADN nu se întîlnește riboza, ci o substanță ce derivă din ea, și anume *dezoxiriboza*, care nu are oxigen în poziția 2.



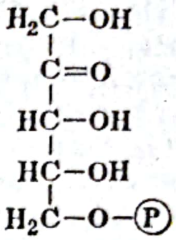
D-riboza-5-fosfat



D-riboză



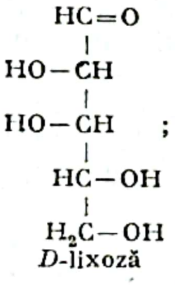
dezoxiriboză



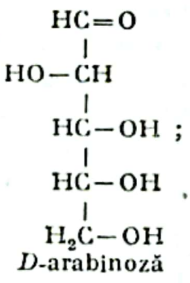
ribuloza-5-fosfat

De asemenea, prin hidrogenarea enzimatică a ribozei se formează ribitolul, care intră în structura vitaminei B_2. Cetoza corespunzătoare, *ribuloza* sub forma ribulozo-5-fosfatului are o mare importanță biologică, făcînd parte dintre intermediarii căii pentozofosfaților.

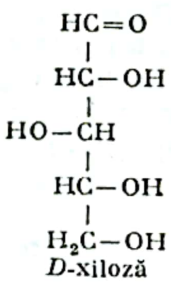
Lixoza a fost identificată — înlocuind ribitolul — într-o formă specială a vitaminei B_2, denumită lixoflavină, care se găsește într-o foarte mică măsură numai în inimă.



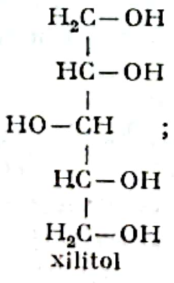
D-lixoză ;



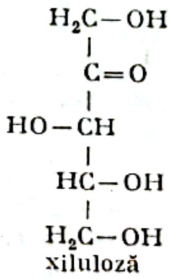
D-arabinoză ;



D-xiloză ;



xilitol ;



xiluloză ;

Arabinoza și *xiloza* sînt larg răspîndite în plante (arabani și xilani-polizaharide formate numai din arabinoză și xiloză), dar nu au funcții fiziologice și biochimice pentru om. Sînt utilizate în bacteriologie pentru teste de identificare a bacteriilor.

Din xiloză se formează, prin hidrogenare, xilitol care are aplicații terapeutice importante, în special în bolile care afectează metabolismul glucidic, prin acțiunea sa de stimulare, printre altele, a sintezei insulinei.

Scanned with OKEN Scanner

Xiluloza este cetoza corespunzătoare xilozei ; trebuie reţinut faptul că în organism se întîlnesc ambele forme — *D* şi *L*. Anticipînd o serie de noţiuni care vor fi prezentate ulterior, se menţionează faptul că pentozele nu sînt identificate decît ca urme în urină, dar concentraţia lor poate creşte în cazul pentozuriei fiziologice sau în al pentozuriei patologice. În primul caz, concentraţia pentozelor creşte tranzitoriu în urină ca urmare a unei alimentaţii bogate în fructe sau în vegetale, deoarece pentozele, nefiind utilizate în organismul uman decît într-o cantitate limitată, se elimină prin urină. Al doilea caz, pentozuria patologică — care este de durată — se datoreşte unei activităţi enzimatice defectuoase.

Hexoze. Cel mai important reprezentant al monozaharidelor este *glucoza*, larg răspîndită atît în regnul vegetal, cît şi în cel animal. Se găseşte liberă, dar şi ca ester fosforic şi intră în structura unor importante polizaharide de origine vegetală — amidonul şi celuloza — şi animală — glicogenul — şi a unor oligozaharide ca maltoza, lactoza, zaharoza. Poate avea o origine exogenă (alimentară) şi una endogenă (de formare în interiorul organismului). Glucoza este materia primă a oxidoreducerilor din organism, proces în urma căruia se eliberează energia necesară tuturor manifestărilor vitale — fizice, intelectualo-nervoase, de sinteză şi de degradare — care au loc în organismul tuturor vieţuitoarelor.

Glucoza exogenă provine în mare parte prin hidroliza enzimatică a amidonului sau a dizaharidelor — lactoza şi zaharoza — introduse odată cu alimentele. După absorbţia sa din intestin este transportată prin vena portă la ficat unde au loc trei procese, şi anume : o parte este metabolizată pentru a se obţine energie, alta este depozitată sub formă de glicogen hepatic, iar a treia parte este eliberată din nou în sînge şi distribuită tuturor celorlalte organe şi ţesuturi. Aşadar, transportul glucozei în organism se face prin sînge unde se găseşte într-o concentraţie riguros menţinută între anumite limite — 80—120 mg% — orice creştere sau scădere de mai lungă durată reprezentînd consecinţa unor grave tulburări metabolice.

Concentraţia glucozei în sînge este denumită *glicemie*, creşterile şi scăderile peste şi sub nivelul normal fiind numite hiper- şi, respectiv, hipoglicemie. Glucoza nu este identificată în mod normal în urină, deoarece e reabsorbită la nivelul rinichilor. Prezenţa glucozei în urină se numeşte *glicozurie* şi se datoreşte fie depăşirii unui anumit „prag" de concentraţie sanguină, fie unei tulburări renale.

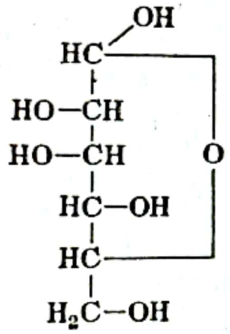
Glucoza se poate forma în organism, la nivelul ficatului prin izomerizarea enzimatică a manozei, a galactozei şi a fructozei, precum şi din substanţe „glucoformatoare", printre care citǎm unii aminoacizi, acidul lactic şi alţi intermediari metabolici. Această posibilitate endogenă de formare a glucozei există numai în ficat şi în rinichi. Dintre derivaţii mai importanţi ai glucozei — care au fost amintiţi mai sus — se menţionează : acidul glucuronic şi sorbitolul, care reprezintă o substanţă de plecare în sinteza în laborator a vitaminei C.

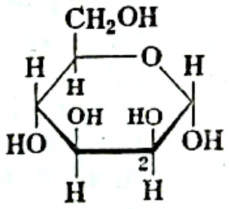
Manoza este un constituent important al polizaharidelor de origine vegetală (manane) şi component al unor glicoproteine ce se găsesc în ser, ca albumina şi globulinele, sau în diverse ţesuturi şi organe. A fost identificată şi în structura unor polizaharide de origine bacteriană, ca în bacilul tuberculos. În ficat, manoza se poate transforma cu uşurinţă în glucoză.

Scanned with OKEN Scanner

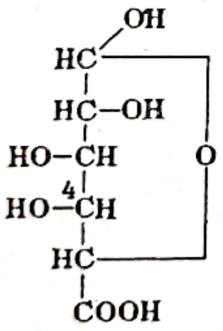
Practic nu se găsește liberă în organism, ci numai ca ester fosforic. Derivații mai importanți ai manozei sînt : manita, poliolul respectiv, care se găsește în mană și în unele alge marine, cu o largă utilizare în industria alimentară (valoarea lor calorică derivînd din posibilitatea transformării în glucoză), și mai ales acizii sialici. Structural, manoza se aseamănă foarte mult cu glucoza (este un epimer), diferența constînd doar în poziția ocupată de hidroxilul de la atomul C_2.

Galactoza se găsește în natură mai ales sub formă de lactoză, dizaharid prezent în lapte. În ficat se transformă cu ușurință în glucoză, din care de-altfel se poate forma endogen printr-un proces specific ce are loc mai ales în glanda mamară în timpul lactației. Este un constituent important atît al unor glicoproteine — substanțe complexe care vor fi tratate ulterior — cît și al unor lipide complexe, glicolipide denumite cerebrozide, care se găsesc în creier și în general în țesutul nervos.

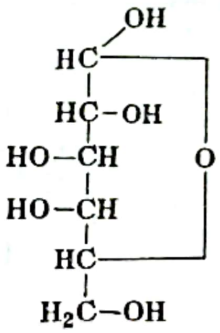


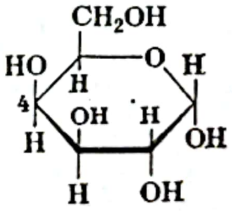


α-D-manoză

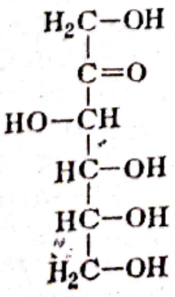


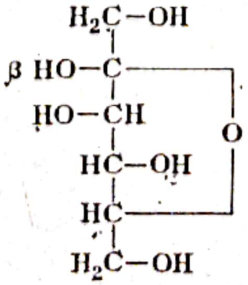
acid D-galacturonic

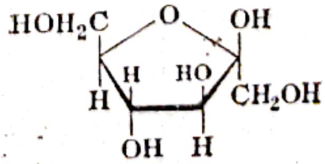




α-D-galactoză



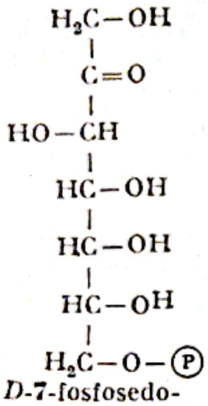




β-D-fructoză

Scanned with OKEN Scanner

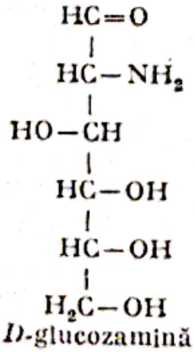
Fructoza este singura cetohexoză importantă din punct de vedere biologic. Se găsește liberă, ca esteri **1** sau **6**, sau **1,6**-difosforic sau în diverse combinații. Se poate transforma cu ușurință în glucoză și se metabolizează prin aceleași secvențe urmate, la o anumită etapă — și de glucoză. Se găsește în fructele dulci, în special în struguri și în mierea de albine, iar în combinație cu glucoza în zaharoză (zahărul comercial), în cîteva trizaharide mai puțin importante din punct de vedere biologic și într-o serie de polizaharide. Este o substanță puternic levogiră, de unde și numele de *levuloză*, forma α rotind planul luminii polarizate cu −133°. Este cel mai dulce monozaharid.

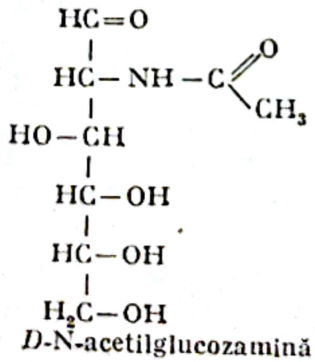

D-7-fosfosedoheptuloză

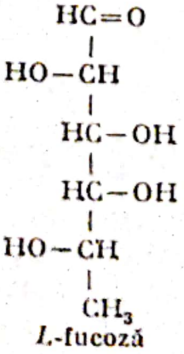
Fructoza are un mare rol în mobilitatea spermatozoizilor și a metabolismului lor energetic, ceea ce explică faptul că în celulele seminale există o cale specifică de transformare enzimatică a glucozei în fructoză, care are loc printr-o serie de procese succesive de hidrogenare. Intermediar se formează sorbitolul.

Heptoze. Singura oză care are 7 atomi de carbon este o cetoză, identificată atît în organismele vegetale, cît și în cele animale, în cantități foarte mici și numai ca ester **7**-fosforic și care se numește *D*-**7**-fosfosedoheptuloză. Această heptoză este un intermediar important în procesul de fotosinteză și în calea de degradare a pentozofosfaților.

1.2.4. COMPUȘI ÎNRUDIȚI CU MONOZAHARIDELE


D-glucozamină


D-N-acetilglucozamină


L-fucoză

Dintre compușii derivați de la glucide vom menționa cîțiva întîlniți frecvent în natură, dar numai dintre cei cu importanță pentru om.

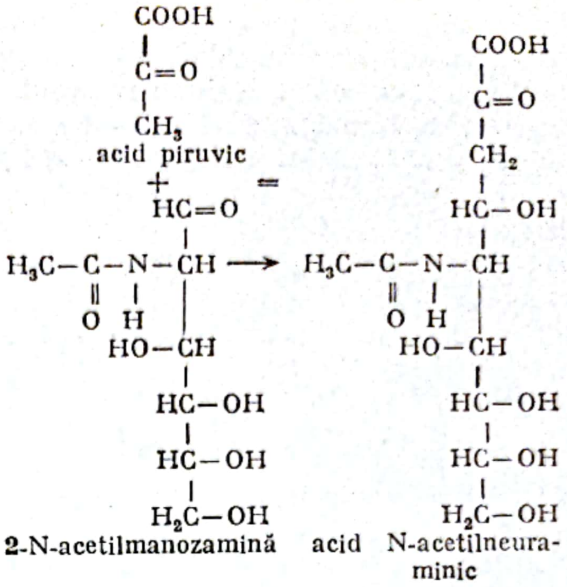
Aminozaharurile sînt glucide care conțin o grupare amino, de obicei în poziția **2** a ozei. Cele mai importante aminozaharuri sînt cele derivate de la aldohexoze, și anume *glucozamina*, *galactozamina* și *manozamina*. Aminozaharurile se pot combina cu acidul acetic, formîndu-se N-acetil derivații respectivi.

Multe dintre heteropolizaharidele umane conțin în structura lor o metilpentoză sau dezoxigalactoză (**6**-dezoxi-*L*-galactoză) care poartă denumirea de *L-fucoză*. Fucoza este un constituent important al glicoproteinelor, dintre care men.

Scanned with OKEN Scanner

ţionăm izoaglutininele responsabile de numeroase reacţii imunologice. În grupa B sangvină de pildă, fucoza se găseşte într-o proporţie de 17%.

În plasmă au mai fost identificaţi o serie de derivaţi cu structură asemănătoare, denumiţi *acizi sialici*, şi care sînt întîlniţi în mod curent în glicoproteinele serice. Acizii sialici derivă de la un compus de bază denumit *acid neuraminic*, care poate avea grefat un număr de radicali diferiţi Acidul neuraminic ia naştere prin condensarea acidului piruvic cu 2-N-acetil-*D*-manozamina.



Doi dintre compuşii acestei clase de substanţe au în poziţia 5, unul radicalul $HO—CH_2—CO—$, iar celălalt un radical acetil $CH_3—CO—$.

1.3. OLIGOZAHARIDE

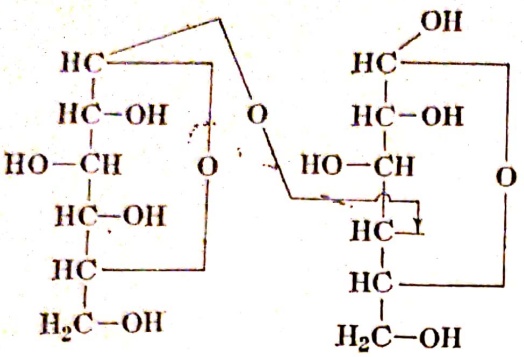
Oligozaharidele sînt substanţe care conţin în structura lor minimum două sau maximum zece monozaharide. Din punct de vedere biologic, cea mai mare importanţă pentru om o au dizaharidele.

În funcţie de modul în care se leagă cele două oze, care pot fi identice sau diferite, se disting două tipuri de dizaharide, şi anume reducătoare şi nereducătoare. În cazul dizaharidelor reducătoare legarea celor două oze se face prin eliminarea unei molecule de apă între hidroxilul semiacetalic al uneia şi unul din hidroxilii alcoolici ai celei de a doua oze, astfel că rămîne liber un hidroxil semiacetalic. Ca o consecinţă firească, dizaharidele reducătoare vor da reacţii pozitive cu reactivii F e h l i n g, T o l l e n s, N y l a n d e r etc. În cel de al doilea caz, legarea ozelor se face prin participarea ambilor hidroxili semiacetalici, fapt care face imposibilă manifestarea proprietăţilor lor reducătoare. Legăturile între două monozaharide la care participă cel puţin un hidroxil semiacetalic se numesc legături glicozidice. Pentru a se preciza care ozăparticipă cu hidroxilul semiacetalic, aceasta poartă sufixul de -ozid (glucoză-glucozid, fructoză-fructozid, galactoză-galactozid).

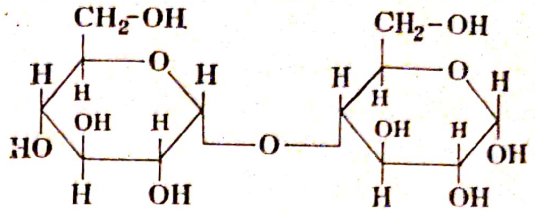
1.3.1. DIZAHARIDE REDUCĂTOARE

Maltoza este un dizaharid format din două molecule de α-glucoză legate glicozidic între atomii C_1 şi C_4, denumirea ei chimică fiind α-glucozido-4-α-glucoză. Maltoza nu e larg răspîndită în natură; ia naştere în intestinul

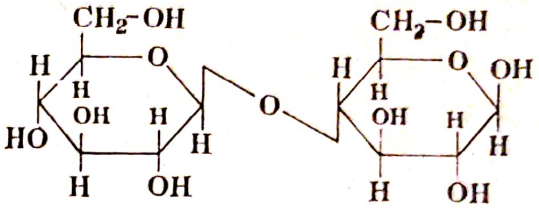
subţire în urma hidrolizei amidonului sau glicogenului de către amilază, o enzimă specifică. Maltoza este ulterior hidrolizată tot enzimatic, sub acţiunea maltazei, la două molecule de α-glucoză. Este posibil să se facă şi o hidroliză neenzimatică, acidă sau alcalină, care se poate, bineînţeles, efectua în laborator, de unde rezultă, ca termen final, α-glucoza.



maltoză
(α-glucozido-4-α-glucoză)

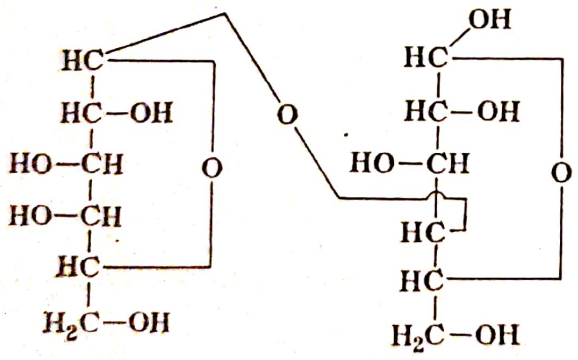


maltoză

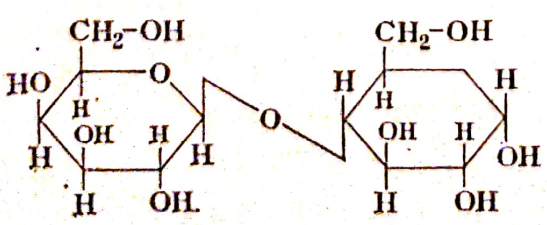


celobioză
(β-glucozido-4-β-glucoză)

Celobioza este considerată unitatea structurală a celulozei, aşa după cum maltoza este considerată unitatea structurală a amidonului. Ca şi maltoza, celobioza ia naştere prin unirea a două molecule de glucoză legate 1,4. Diferenţa constă în faptul că cele două molecule sînt de β-glucoză şi nu de α-glucoză ca în cazul maltozei. Diferenţa aceasta, în aparenţă minoră, are consecinţe biologice deosebite, deoarece în organismul uman nu există enzime capabile să desfacă legătura sau legăturile formate între resturile de β-glucoză. Rezultatul este că celuloza nu are practic nici o valoare alimentară, energetică, pentru om, neputîndu-se hidroliza sub acţiunea enzimelor digestive.



lactoză
(β-galactozido-4-α-glucoză)



Celobioza, ca şi maltoza, păstrează un hidroxil semiacetalic liber şi deci va da reacţii pozitive cu reactivii Fehling, Tollens etc.

Lactoza este un alt dizaharid reducător, cu mare importanţă biologică. Se găseşte în laptele tuturor mamiferelor, dar în proporţii diferite, în funcţie de specia animală respectivă, variind între 1,0 şi 8,0 g%, fiind denumit „zahăr de lapte". Laptele de femeie conţine 7,1 g%, iar cel de vacă 4,8 g%.

Lactoza este formată dintr-o moleculă de β-galactoză şi una de α-glucoză, legarea făcîndu-se între hidroxilul semiacetalic al galactozei şi

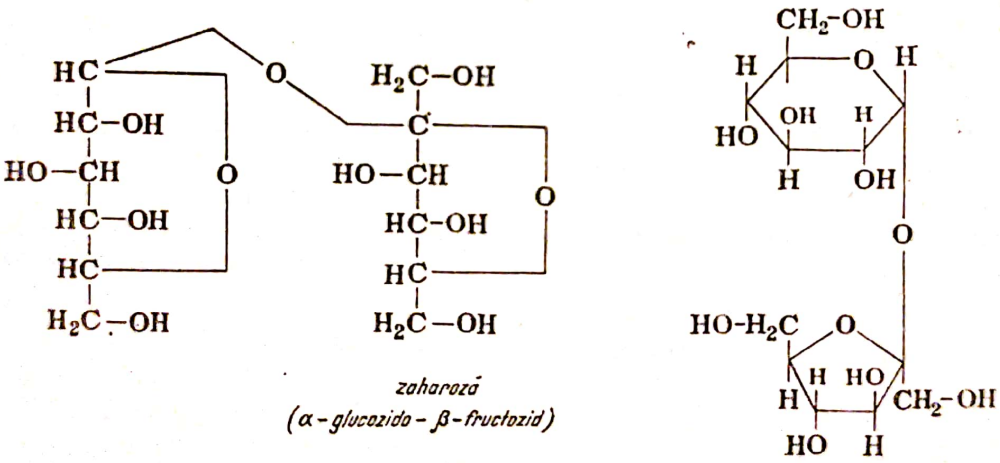
cel alcoolic secundar din poziția 4 al α-glucozei. Lactoza este degradată în intestin sub acțiunea unei enzime denumită β-galactozidază sau lactază.

În afară de maltoză, celobioză și lactoză mai menționăm încă două dizaharide reducătoare, mai puțin importante din punct de vedere biologic, și anume *gențiobioza*, care este β-glucozido-**6**-β-glucoză și intră în structura unui trizaharid, *gențianoza*, care, în afară de cele două molecule de β-glucoză mai conține și o moleculă de fructoză. Celălalt dizaharid este *melibioza* sau α-galactozido-**6**-α-glucoza, ce intră și el în structura unui trizaharid, și anume *rafinoza*, format din galactoză, glucoză și fructoză, și care se găsește în mod curent în zahăr, fiind un constituent al sfeclei de zahăr.

1.3.2. DIZAHARIDE NEREDUCĂTOARE

Zaharoza, zahărul comercial, care se extrage din sfecla și din trestia de zahăr este cel mai important dizaharid pentru om. Este o substanță sintetizată în natură exclusiv în regnul vegetal și are o deosebită importanță energetică pentru om. Este formată prin unirea α-glucozei și β-fructozei prin intermediul celor doi hidroxili semiacetalici.

Zaharoza este solubilă în apă și are o putere rotatorie de + 66°. Hidroliza ei se poate realiza enzimatic *in vivo*, sau cu acizi și baze *in vitro*; hidrolizatul rotește lumina polarizată spre stînga, deoarece fructoza liberă este mai levorotatoare (—133°) decît este glucoza dextrogiră (+112°). De aici denumirea de zahăr invertit și vechea denumire a enzimei care determină hidroliza zaharozei-invertază.



zaharoză
(α-glucozido-β-fructozid)

Alt dizaharid nereducător este *trehaloza*, formată din două molecule de α-glucoză. A fost identificată în mai multe surse vegetale, precum și în componența unor bacterii, ca de exemplu *Mycobacterium tuberculosis*.

1.4. POLIZAHARIDE

Polizaharidele sînt răspîndite în natură, avînd rol de susținere, de constituție sau de rezervă. Se disting *holopolizaharide*, formate practic numai din oze, ca amidonul, celuloza sau glicogenul, sau *heteropolizaharide*, ca glico-

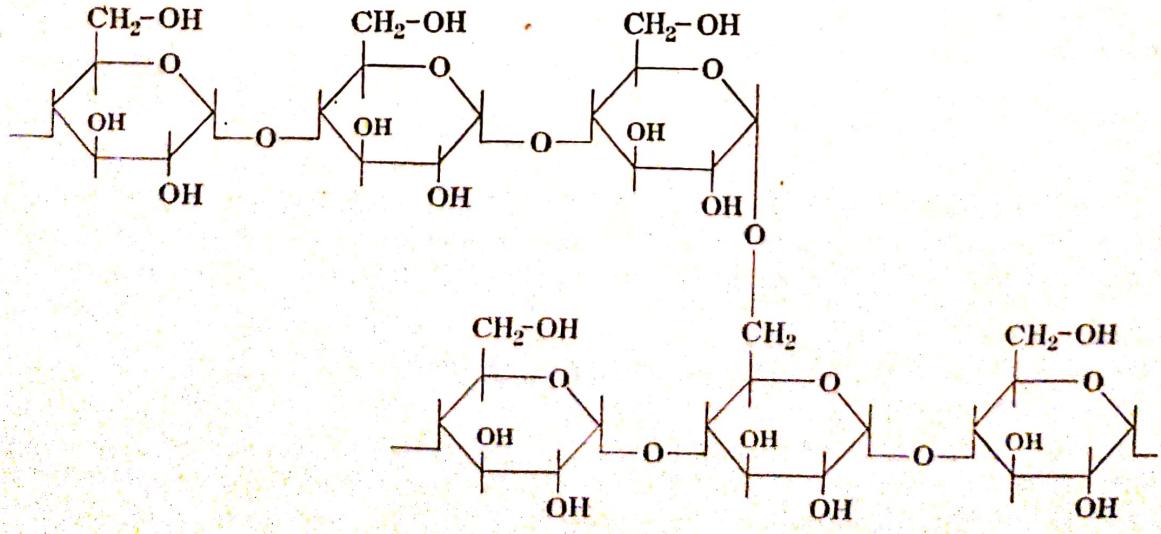
Scanned with OKEN Scanner

proteinele, lipoproteinele sau mucopolizaharidele, în structura cărora, în afară de oze, mai sînt prezente şi componente neglucidice, ca de exemplu proteine.

Amidonul este un polizaharid alcătuit din α-glucoză, foarte răspîndit în natură şi cu valoare alimentară deosebită, constituind aproximativ 50% din glucoza exogenă utilizată de organismul uman. Este puţin solubil în apă, cu care formează o cocă. Prin încălzire (60—80°C) se solvă, dînd naştere unei soluţii coloidale. Nu are proprietăţi reducătoare, fapt care denotă că practic toţi hidroxilii semiacetalici sînt angajaţi în legături glicozidice. În prezenţa iodului amidonul dă o culoare albastră, datorită formării unui complex; iodul se absoarbe la suprafaţa amidonului şi lasă să treacă numai razele albastre ale luminii. Ca o confirmare că iodul nu se leagă covalent de amidon este faptul că prin încălzire culoarea albastră dispare, şi că printr-o hidroliză menajată culoarea se schimbă odată cu scăderea masei moleculare relative a amidonului. Astfel, culoarea albastră pe care o dă amidonul trece succesiv la roşu-violaceu, roşu, iar în cele din urmă dispare, aceasta marcînd scăderea masei moleculare cu formarea, în ordine, a următorilor compuşi: amilo-, eritro- şi respectiv acrodextrine.

Ca termen final al hidrolizei enzimatice se formează maltoza, iar ca termen final al hidrolizei acide sau alcaline, α-glucoza. De aici concluzia că amidonul este format dintr-un număr ridicat de resturi de α-glucoză, care variază în funcţie de sursa vegetală din care a fost extras. Ca urmare firească, masa moleculară relativă a amidonului este cuprinsă între cîteva sute şi aproximativ 500 000. Resturile de glucoză sînt unite între ele prin legături **1,4**, luînd naştere aşa-numitul amidon liniar, iar din loc în loc se formează legături **1,6**, producîndu-se ramificaţii.

La amidon se observă două componente distincte, localizate diferit în grăunţele de amidon; în interiorul grăunţelor se află o componentă cu structură liniară denumită *amiloză* sau *n-amiloză*, iar în exterior o componentă cu structură ramificată care poartă numele de *amilopectină* sau *izoamiloză*. Studii mai aprofundate au arătat că amiloza este formată din aproximativ 100—150 de unităţi de glucoză legate **1,4**, nu însă perfect



Scanned with OKEN Scanner

liniar, ci spiralat (fig. 1). Diferenţele structurale ale amidonului au putut fi puse în evidenţă şi prin modul diferit în care acţionează o serie de enzime care au capacitatea de a-l hidroliza. Astfel, există două enzime, α- şi β-amilaza, care sînt capabile să desfacă legăturile α-**1,4** prima la extremitate, iar a doua în interiorul moleculei de amidon. Legăturile **1,6** pot fi desfăcute numai de către o enzimă specifică, o α-**1,6**-glucozidază.

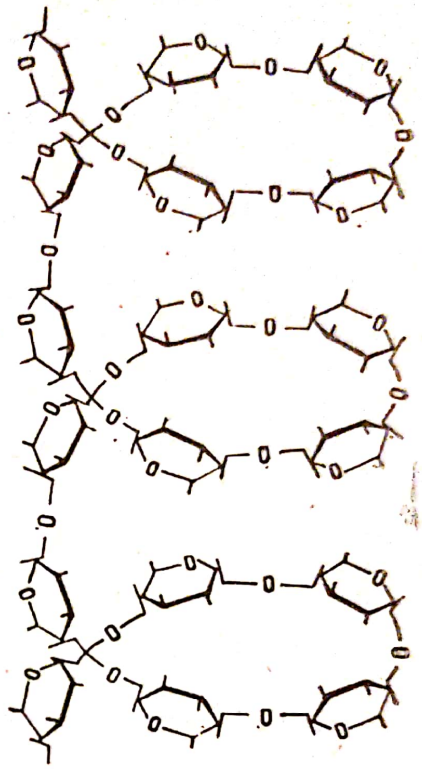


Fig. 1. Structura helicoidală a amilozei.

Este interesant de amintit că în amidon au mai fost identificate şi alte componente, ca : acid fosforic, diferiţi acizi graşi şi chiar alte oze decît glucoza, iar în cantităţi mici, Cu^{2+}, Fe^{2+}, Mg^{2+} etc.

Glicogenul, format tot din glucoză, reprezintă forma de rezervă, de depozit a glucozei în organismele animale. Se găseşte în cantitate mare în ficat şi în muşchi, iar în urme şi în alte organe. Ca structură, glicogenul este asemănător cu amilopectina din amidon, fiind deci puternic ramificat. Se apreciază că după 3—12 unităţi de glucoză ia naştere o ramificaţie, o legătură **1,6**. Lungimea porţiunii liniare depinde de natura organului şi de activitatea metabolică a acestuia. Glicogenul este solubil în apă, formînd o soluţie opalescentă, dar insolubil în alcool. Cu iodul dă o coloraţie mai închisă decît amidonul. Datorită analogiei de structură, este hidrolizat în intestin sub acţiunea aceloraşi enzime care acţionează şi asupra amidonului. Cercetări recente au pus în evidenţă existenţa mai multor tipuri de glicogen, cu mase moleculare foarte diferite, cuprinse între cîteva mii şi 1—7 milioane.

Glicogenul hepatic are o masă moleculară mai mare de cinci milioane, este aşadar deosebit de polimerizat. Pentru a ocupa un spaţiu cît mai mic în interiorul celulei hepatice, molecula înalt polimerizată a glicogenului are aspectul unei sfere în care se disting trei tipuri de lanţuri care se diferenţiază între ele prin legăturile **1,4** sau **1,6** cu care sînt unite resturile de glucoză (fig. 2). Lanţurile *A* şi *B* au în capătul lor terminal o moleculă de glucoză care are hidroxilul din poziţia **4** liber, iar lanţul *C* are liber hidroxilul semiacetalic — reducător.

Celuloza, formată prin unirea β-glucozei exclusiv prin legături **1,4**, este substanţa de susţinere a plantelor, reprezentînd aproximativ 50% din totalul carbonului organic al biosferei. Cu toate acestea, celuloza nu are decît o valoare energetică limitată, datorită faptului că în organismul uman nu există sisteme enzimatice care să desfacă legătura β-glicozidică care se realizează între unităţile de β-glucoză. O cantitate limitată de celuloză este desfăcută sub acţiunea enzimelor florei intestinale aflată în

Scanned with OKEN Scanner

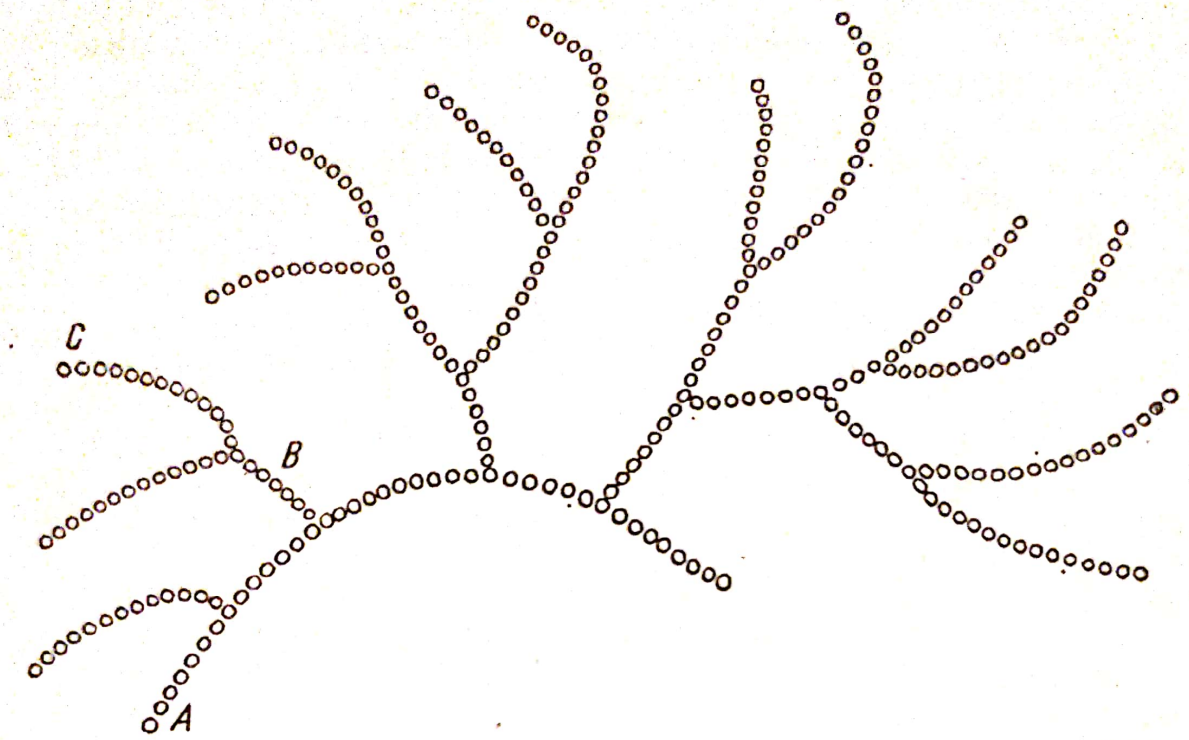


Fig. 2. Stuctura ramificată a glicogenului.

intestinul gros. Celuloza are însă un rol fiziologic destul de important în motilitatea intestinală.

Există în regnul vegetal şi alte holopolizaharide cu o valoare biologică mult mai mică pentru om decît a celor menţionate mai sus. Ele au însă numeroase aplicaţii practice. Astfel, *dextranul*, polizaharid format din α-glucoză legată **1,6**, dar avînd numeroase ramificaţii, cu masă moleculară mare, este un bun înlocuitor al plasmei sangvine şi se administrează în hemoragii. *Agar-agar*-ul, polizaharid utilizat ca mediu de cultură în bacteriologie şi ca suport pentru electroforeză şi imunoelectroforeză, este un polizaharid alcătuit din α-fructoză legată prin legături **1,3** şi **1,4**. *Inulina*, formată din β-fructoză legată **1,2** este utilizată la determinarea spaţiilor extracelulare şi a vitezei de filtrare glomerulară.

Scanned with OKEN Scanner

2 LIPIDE

2.1. DEFINIŢIE, CLASIFICARE, ROL BIOLOGIC

Lipidele sînt substanţe naturale insolubile în apă, solubile însă în solvenţi organici ca benzen, eter, cloroform, eter de petrol etc., cu ajutorul cărora pot fi extrase din materialele biologice. În marea lor majoritate lipidele conţin acizi graşi cu mai mult de opt atomi de carbon, esterificaţi, cel mai adesea cu glicerolul sau sfingozina, doi alcooli polihidroxilici.

Lipidele au un rol metabolic deosebit de important, cercetările de dată recentă punînd permanent în evidenţă noi aspecte privind interrelaţiile lor metabolismului lipidic cu metabolismul glucidic şi proteic.

Lipidele au un rol energetic de prim rang, fiind clasa de substanţe care pot elibera cea mai mare cantitate de energie, mai mare decît glucidele, şi anume 9,3 calorii/g faţă de 4 calorii/g. Rolul energetic este deţinut de acizii graşi care sînt eliberaţi prin hidroliză din trigliceride. Lipidele,

mai ales fosfolipidele, sînt componente de bază ale structurii formaţiunilor subcelulare, în special a membranei, au aşadar un rol plastic-structural dintre cele mai importante.

De asemenea, lipidele, şi mai cu seamă trigliceridele, protejează corpul de frig şi de şocuri mecanice. În sfirşit, lipidele, prin fosfolipide, uşurează şi permit transportul electronilor de-a lungul trunchiului nervos, participînd la transmiterea impulsului nervos.

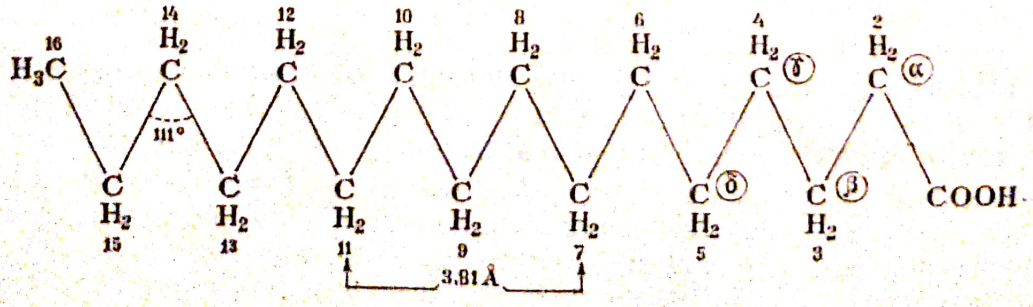
2.2. STRUCTURA ŞI PROPRIETĂŢILE PRINCIPALILOR COMPONENŢI AI LIPIDELOR

2.2.1. ACIZII GRAŞI

Acizii graşi sînt consideraţi compuşii de bază ai lipidelor. Din celule au fost izolaţi peste 70 de acizi graşi, care, deşi prezintă structuri variate, au o serie de caracteristici comune şi anume : au minimum 8 atomi de carbon ; au întotdeauna un număr par de atomi de carbon ; au o grupare carboxil terminală. Se găsesc într-o cantitate limitată în stare liberă, majoritatea intrînd în structura diverselor tipuri de lipide, mai ales în trigliceride. Acizii graşi pot fi clasificaţi după cum urmează :

— cu catenă normală saturată ;
— cu catenă normală nesaturată ;
— acizi graşi speciali : — acizi-alcooli ;
— acizi ramificaţi ;
— acizi ciclici.

2.2.1.1. *Acizii graşi saturaţi* importanţi din punct de vedere biologic au între 14 şi 24 atomi de carbon, purtînd, în ordine, următoarele denumiri : *acid miristic* (14), *acid palmitic* (16), *acid stearic* (18), *acid arahidic*(20), *acid behenic* (22) şi *acid lignoceric* (24). Cei mai însemnaţi acizi graşi din această clasă sînt cei cu 16 şi 18 atomi de carbon, şi anume acidul palmitic şi cel stearic. Acizii graşi au o origine exogenă şi una endogenă. Lanţul de atomi de carbon nu este liniar, ci are o configuraţie spaţială, determinată de existenţa unor unghiuri egale de 111° între doi atomi de carbon. Distanţa între 4 atomi de carbon este de 3,81 Å. Formula spaţială a acidului palmitic este următoarea :



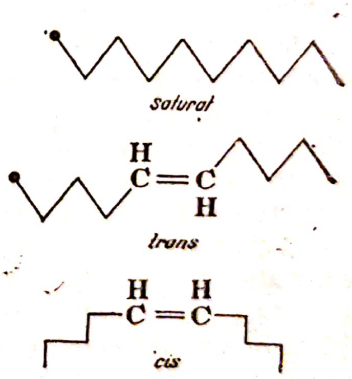
Începînd cu primul atom de carbon, după cel carboxilic, atomii de carbon se notează cu litere greceşti, de obicei numai primii trei, deoarece la aceştia au loc reacţiile de degradare metabolică, aşadar atomii C_2, C_3 şi C_4 mai sînt notaţi cu α, β şi γ.

2.2.1.2. *Acizii graşi nesaturaţi* se găsesc în lipide într-o cantitate mai mare decît cei saturaţi, reprezentînd aproximativ 75% din totalul acizilor graşi constituenţi ai lipidelor. Principalii acizi nesaturaţi au 18, 20 sau 24 atomi de carbon şi una, două, trei sau patru duble legături. Datorită existenţei dublei (sau dublelor) legături, şi faţă de aceasta, catena atomilor poate avea o conformaţie *cis* sau *trans*. În cazul izomerilor *trans* conformaţia spaţială a acizilor graşi respectivi se aseamănă cu aceea a acizilor graşi saturaţi. Acizii graşi nesaturaţi naturali au, în majoritate, conformaţia izomerului *cis*.

Exemplul cel mai des citat este acela al *acidului oleic*, unul din cei mai răspîndiţi acizi graşi din natură şi care are o conformaţie *cis*. Izomerul *trans* se numeşte *acid elaidic* şi nu este întîlnit în natură.

Poziţia în spaţiu mai contorsionată a acizilor graşi nesaturaţi, care au catena atomilor de carbon dispusă în *cis* faţă de dubla sau dublele legături, se pare că are o semnificaţie biologică aparte, dat fiind faptul că toţi acizii graşi care au fost identificaţi în membranele celulare sînt izomeri *cis*. Trebuie remarcat faptul că dublele legături nu sînt niciodată conjugate sau la distanţe întîmplătoare una de cealaltă, ci întotdeauna separate de un grup metilen, deci dublele legături se vor afla din trei în trei atomi de carbon. Cei mai răspîndiţi acizi graşi nesaturaţi sînt acizii: *oleic*, *linoleic*, *linolenic* şi *arahidonic*; în afară de aceştia se mai întîlnesc şi *acizii palmitoleic* şi *nervonic*.

Schema de mai jos prezintă acizii graşi nesaturaţi, numărul de atomi de carbon, poziţia dublelor legături şi numărul lor. Pentru intuirea structurii acizilor graşi nesaturaţi se utilizează notarea internaţională şi anume: după numele lor se introduc, într-o paranteză, o serie de cifre care indică, în ordine: numărul de atomi de carbon, numărul dublelor legături; precizarea poziţiei dublelor legături prin litera grecească Δ urmată de cifra corespunzătoare primului atom de carbon din această legătură. De exemplu, acidul linolenic care are 18 atomi de carbon, 2 duble legături situate în poziţiile **9-10** şi **12-13** se va nota: acid linolenic (18 : 2 ; Δ **9**, **12**) (fig. 3).



2.2.1.3. *Acizii graşi esenţiali* s-au identificat acum aproximativ patruzeci de ani, cînd s-a constatat că lipsa unor factori lipidici din hrana animalelor de experienţă determină tulburări metabolice grave ca: întîrzieri în dezvoltare, dermite, căderea părului, necroze, tulburări de reproducere etc. Aceste simptome dispăreau însă după introducerea în alimentaţie a acizilor graşi nesaturaţi. Ulterior s-a putut identifica că tulburările se produc numai cînd lipsesc acizii linoleic, linolenic şi arahidonic, care se numesc acizi graşi esenţiali şi care, iniţial, fuseseră trecuţi în rîndul vitaminelor (constatîndu-se însă mai tîrziu că nu îndeplinesc condiţiile necesare pentru a fi consideraţi vitamine). Nici astăzi nu se cunoaşte cu precizie mecanismul lor de acţiune, dar s-au determinat

o serie de fapte care le atestă importanţa şi nivelul biologic la care acţionează.

Aceşti acizi graşi trebuie introduşi prin hrană, deoarece nu sînt sintetizaţi de organismele animale, care nu au enzima ce determină procesele de dehidrogenare.

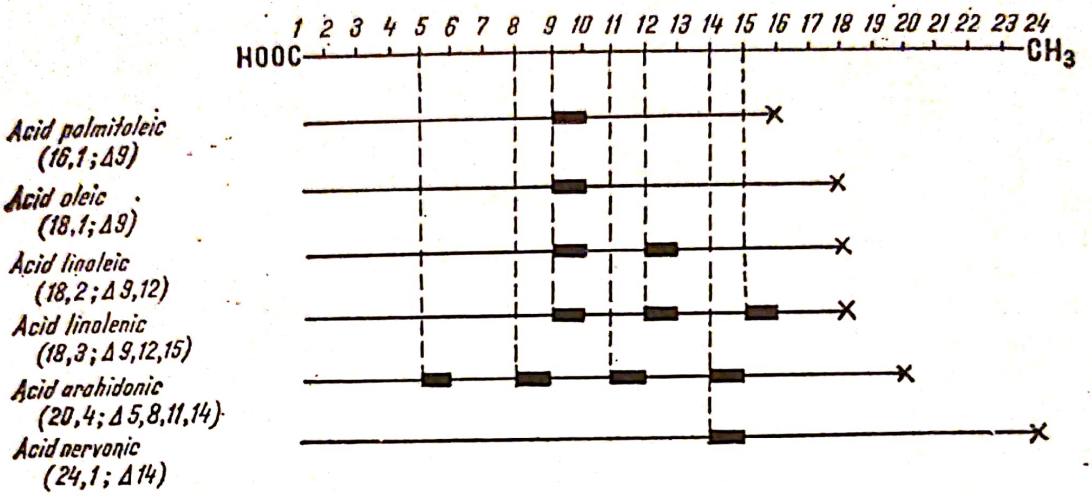


Fig. 3. Principalii acizi graşi nesaturaţi din lipide.

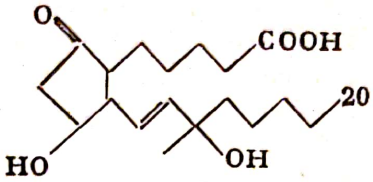
Rezumînd ultimele rezultate ale numeroaselor cercetări efectuate în această direcţie, se subliniază că una din principalele cauze ale multiplelor tulburări pe care le provoacă lipsa acizilor graşi esenţiali din organism este legată de faptul că toţi aceştia intră în compoziţia fosfolipidelor. Ori, aceste lipide complexe sînt componentele de bază ale membranelor celulare, ale mitocondriilor şi ale ţesutului nervos. S-a constatat, de asemenea, că acizii graşi esenţiali sînt activatori a numeroase enzime care acţionează atît în metabolismul lipidic, cît şi în alte metabolisme. În sfîrşit, acizii graşi esenţiali sînt precursorii unor componente de mare importanţă metabolică, şi anume a prostaglandinelor.

2.2.1.4. *Acizii graşi speciali* includ substanţe cu structuri diferite. *Prostaglandinele* sînt acizi graşi ciclici care au fost descoperiţi de către von Euler încă din anul 1935. Numele li se datoreşte faptului că au fost izolate pentru prima oară din plasma seminală a prostatei umane. Primul efect biologic pus în evidenţă a fost capacitatea acestora de a stimula muşchii netezi, şi anume ai uterului. Au trebuit să treacă însă aproape 30 de ani pînă cînd un grup de cercetători danezi şi suedezi (Samuelsson, Bergstrom), au reuşit să le precizeze structura şi funcţiile. Studiul chimic şi biologic al prostaglandinelor a fost mult îngreunat de faptul că aceste substanţe sînt sintetizate în organism într-o cantitate extrem de mică, fiind pe de altă parte metabolizate deosebit de rapid.

Prostaglandinele sînt acizi graşi care conţin 20 de atomi de carbon şi un ciclu ciclopentanic, toate prostaglandinele derivînd, teoretic, de la acidul prostanoic. Datorită structurii relativ simple, astăzi prostaglandinele sînt sintetizate în laborator, permiţînd atît studiul acţiunii lor, cît şi utilizarea ca medicamente în diverse domenii — ginecologie, endocrinologie etc.

Scanned with OKEN Scanner

Există mai multe tipuri de prostaglandine cunoscute astăzi, şi anume: prostaglandinele *A* (PG*A*), *B*(PG*B*), *E*(PG*E*) şi *F*(PG*F*), care diferă între ele prin natura radicalilor, în special a celor din poziţiile **9**, **11**, **15** şi **19**, prin numărul de duble legături, care pot fi în poziţiile **5**, **10**, **13** şi **17**, precum şi prin alte caracteristici structurale. Trebuie reţinut faptul că fiecare dintre aceste tipuri principale de prostaglandine au specificităţi funcţionale care le diferenţiază net şi au, la rîndul lor, un număr diferit de reprezentanţi.

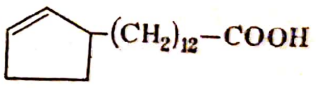


PG*E*

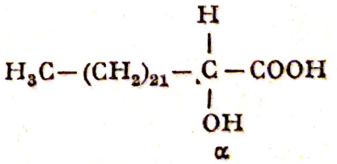
Rolul biologic al prostaglandinelor este într-o bună măsură corelat cu cel al acizilor graşi esenţiali, în special cu acidul arahidonic, deşi acţiunile lor nu sînt identice.

Prostaglandinele au un rol aparte în reglarea secreţiilor tractului genito-urinar şi în contracţia muşchilor netezi. În afară de aceasta joacă un mare rol şi în reproducere. Unul dintre cele mai de seamă roluri biologice ale prostaglandinelor este efectul lor direct asupra lipolizei, proces de catabolizare a lipidelor. Acest efect se datoreşte, pe de o parte, acţiunii lor asupra lipazelor, cît şi asupra metabolismului unui mediator chimic de deosebită importanţă şi anume AMP_c. Se pare că sediul formării lor este membrana celulară a tuturor ţesuturilor, deci au şi un evident rol în reglarea funcţiei membranelor; nefiind depozitate nicăieri în organism, sinteza lor trebuie să fie continuă, cu intensităţi dependente de condiţiile metabolice normale sau patologice. Se presupune, pentru a explica diversitatea acţiunii lor metabolice, că prostaglandinele constituie un sistem de legătură între hormoni şi sistemul nervos, cu transmiterea de semnale prin sinapse în sistemul nervos.

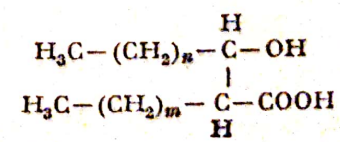
O sinteză crescută poate avea loc în diferite condiţii patologice, ca de exemplu în diferite afecţiuni ale plămînilor (anafilaxie), ale rinichilor (reglarea presiunii sangvine), a creierului (stimulări ale nervilor senzoriali periferici), ale pielii (eczeme) etc. Această sinteză crescută se datoreşte încercării organismului de a restabili echilibrul modificat.



acid chaulmoogric



acid cerebronic



$n = 14,6$
$m = 13,15$
acizii mycolici

Acizii chaulmoogric şi *hidnocarpic* sînt alţi doi acizi graşi ciclici, de o mai mică importanţă biologică. Au fost identificaţi în uleiul de chaulmoogra, acidul chaulmoogric fiind mult timp întrebuinţat în tratamentul leprei.

Dintre acizii-alcooli, principalul reprezentant este *acidul cerebronic*, acid cu 24 atomi de carbon şi cu o grupare hidroxilică la atomul C_2.

Acizii graşi ramificaţi, de o mai mică importanţă biologică pentru animale, au fost identificaţi

mai ales în bacterii, aşa cum sînt cele tuberculoase. Principalii lor reprezentanţi sînt *acidul tuberculostearic* (*acid 10-metilstearic*) şi *acizii micolici* care sînt responsabili de coloraţia Ziehl-Nielson a bacililor acidorezistenţi.

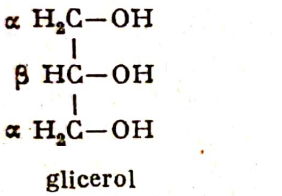
2.2.1.5. *Proprietăţile fizico-chimice generale ale acizilor graşi:* sînt substanţe insolubile în apă, solubile în solvenţi organici. Formează cu NaOH, KOH, NH_4OH săpunuri, care sînt solubile în apă.

În cazul acizilor graşi saturaţi punctul de topire creşte proporţional cu creşterea numărului atomilor de carbon (acidul miristic 53,9°, stearic 69,6° etc.). Acizii graşi nesaturaţi au puncte de topire foarte scăzute, fiind lichizi la temperatura camerei.

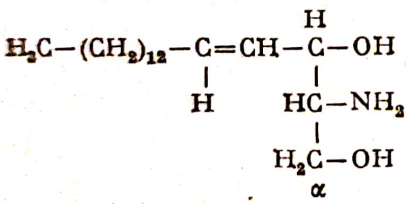
Datorită dublelor legături, acizii graşi nesaturaţi pot adiţiona hidrogen, halogeni etc.

2.2.2. ALŢI COMPONENŢI CONSTITUTIVI AI LIPIDELOR

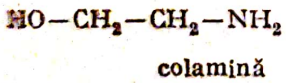
În afară de acizii graşi, în lipide distingem şi o serie de compuşi cu structuri variate. De menţionat în primul rînd *glicerolul*, un polialcool care prin esterificare cu acizii graşi formează trigliceridele. Se întîlneşte şi în glicerofosfolipide. Cei doi atomi de carbon la care se află grupările de alcool primar sînt denumiţi α, iar al treilea atom de carbon, la care este gruparea alcool secundar se notează cu β. Glicerolul poate fi introdus în organism prin digestia trigliceridelor alimentare, dar în cea mai mare parte este sintetizat chiar în organisme, are deci o proveniență endogenă.



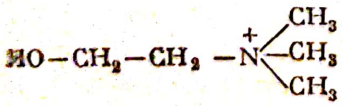
glicerol



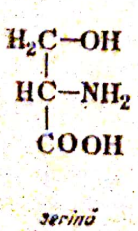
sfingozină



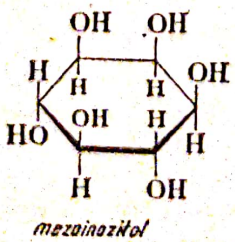
colamină



colină



serină



mezoinozitol

Un alt poliol important este *sfingozina*, care se formează endogen printr-un proces de biosinteză bine precizat astăzi. Este alcoolul întîlnit în structura sfingomielinelor.

Atît glicerolipidele, cît şi sfingolipidele, cele două clase principale de lipide, conţin în structura lor — în afară de acizi graşi, glicerol sau sfingozină — şi *colină*, *colamină*, *serină* şi *mezoinozitol*.

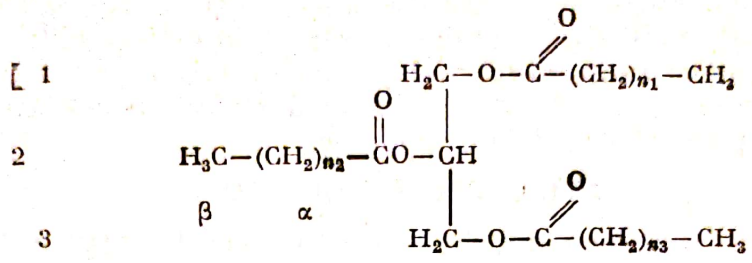
2.3. LIPIDE SIMPLE

2.3.1. GLICERIDELE

Gliceridele, grăsimi neutre sau, după nomenclatura modernă, acil-gliceroli, sînt esteri ai glicerolului cu acizi graşi. Re-

Scanned with OKEN Scanner

prezintă forma de depozit a lipidelor şi sînt localizate în ţesutul adipos. Gliceridele sînt diferenţiate între ele prin numărul de acizi graşi care le esterifică (unu, doi sau trei), putînd fi mono-, di- sau trigliceride, sau prin natura acestor acizi graşi, care pot fi identici sau diferiţi. În organismele animale nu întîlnim practic decît trigliceride, iar marea majoritate a acizilor graşi care esterifică glicerolul sînt nesaturaţi.



trigliceride

Datorită faptului că proprietăţile hidroxilului secundar, din poziţia β, nu sînt identice cu acelea ale hidroxililor primari din poziţiile α, nici stabilitatea radicalului acil nu este aceeaşi. Sub acţiunea lipazelor sînt scindaţi preferenţial radicalii acil din poziţiile **1** şi **3**, deci de la atomii de carbon α. Aceasta se datoreşte faptului că poziţia în spaţiu a celor trei radicali acil nu este identică, cel din poziţia β fiind dispus în stînga lanţului carbonic, similar seriei *L* a glucidelor.

Principalul rol biologic al gliceridelor este acela de depozit al acizilor graşi, aceştia fiind metabolizaţi ulterior în celule, obţinîndu-se astfel energia necesară activităţilor vitale. Trebuie menţionat faptul că depozitarea trigliceridelor în ţesutul adipos se poate face practic fără limite, ceea ce nu este posibil cu alte substanţe de depozit, ca de exemplu glicogenul.

2.3.1.1. *Proprietăţile fizico-chimice ale gliceridelor:* sînt substanţe insolubile în apă, solubile însă în solvenţi organici ca eterul, cloroformul, eterul de petrol etc. Starea lor de agregare depinde de raportul dintre acizii graşi saturaţi şi cei nesaturaţi. Astfel untul, unde domină cei saturaţi (60 : 40), va fi solid la temperatura camerei, în timp ce untdelemnul, în care raportul este net inversat în favoarea acizilor nesaturaţi (11 : 89), este lichid.

Gliceridele pot fi hidrolizate *in vitro* de către hidroxizii tari KOH, NaOH, cu formare de săpunuri, proces care se numeşte saponificare, iar *in vivo* acizii graşi, mai ales cei din trigliceride sînt desfăcuţi sub acţiunea unor enzime, ca lipaza sau lipoproteinlipaza.

2.3.2. CERIDELE

Ceridele sînt o clasă de substanţe asemănătoare ca structură cu gliceridele, în locul glicerolului aflîndu-se un alcool cu masă moleculară mare, avînd între 16 şi 32 atomi de carbon. Răspîndite mai ales în regnul vegetal, în regnul animal joacă doar un rol de protecţie. În ultimul timp începe să li se acorde o importanţă mărită, ceridele fiind identificate şi în structura membranelor de hematii şi a altor tipuri de celule.

Scanned with OKEN Scanner

2.4. LIPIDELE COMPLEXE — FOSFOLIPIDELE

Această importantă clasă de substanţe se împarte, după cum s-a mai arătat, în două subclase — fiecare din ele cu seria respectivă de reprezentanţi — şi anume *glicerofosfatide* (glicerofosfolipide) şi *sfingolipide*. În primul caz, alcoolul esterificat este glicerolul, iar în al doilea sfingozina. Datorită numărului mare de compuşi identificaţi în natură este greu de făcut o clasificare definitivă a fosfolipidelor. Este posibil ca o parte din esterii sfingozinei, incluşi în momentul de faţă în clasa lipidelor, avînd în aparenţă structuri şi proprietăţi biologice, chimice şi fizice asemănătoare acestora, să fie încadraţi în alte clase, dacă se iau în consideraţie unele proprietăţi complet diferite de ale lipidelor.

2.4.1. GLICEROFOSFOLIPIDELE

Toţi compuşii care fac parte din această subclasă conţin în structura lor glicerol esterificat cu două molecule de acizi graşi : în poziţia α se află un acid gras saturat avînd cu precădere 16 sau 18 atomi de carbon, iar în poziţia β unul nesaturat putînd fi cu 16 atomi de carbon şi o dublă legătură sau cu 18 atomi de carbon şi una sau două duble legături, sau cu 20 atomi de carbon şi patru legături duble. Gruparea hidroxil din cealaltă poziţie α este esterificată cu acid *o*-fosforic. Compuşii avînd această structură se numesc *acizi fosfatidici*.

Acizii fosfatidici nu se găsesc liberi decît într-o concentraţie redusă, fiind de fapt intermediari în biosinteza fosfoglicerolipidelor. Datorită prezenţei radicalului fosfat în molecula lor, acizii fosfatidici sînt solubili în apă.

Prin esterificarea acidului fosforic din acizii fosfofatidici cu o serie de alcooli rezultă diverşii reprezentanţi ai glicerofosfolipidelor (tab. 1).

Fosfatidilcolina (*lecitina*) (lekithos = gălbenuş de ou) este o substanţă formată din esterificarea acidului fostatidic cu aminoalcoolul numit colină (trimetilaminoetanol).

Acidul gras nesaturat este, de cele mai multe ori, acidul oleic (18 : 1 ; Δ **9**) sau acidul linoleic (18 : 2 ; Δ **9, 12**), iar acizii graşi saturaţi sînt acizii palmitic (16 atomi carbon) sau stearic (18 atomi carbon).

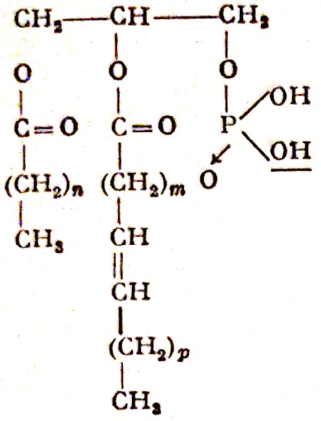
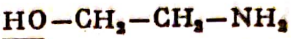
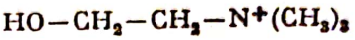
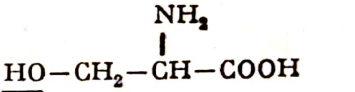
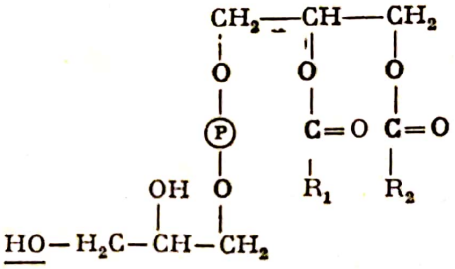
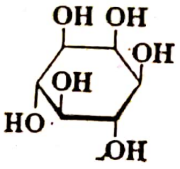
Fosfatidilcolina este larg răspîndită în organismele animale, ca şi în cele vegetale dealtfel, găsindu-se fie liberă, fie împreună cu alte substanţe care intră în compoziţia unor edificii structurale deosebit de complexe, ca de exemplu membranele celulare.

După cum se poate observa din formula prezentată, fosfatidilcolina are la gruparea fosfat o încărcătură net negativă, în timp ce azotul cuaternar din structura colinei are o încărcătură pozitivă. Aceasta face ca fosfatidilcolina să se prezinte ca o substanţă „amfoteră" (amphotera = de ambele feluri) (amănunte în capitolul „Aminoacizii"). Datorită existenţei acestor sarcini electrice, fosfatidilcolina face parte din lipidele polare. Dealtfel, datorită acestei proprietăţi, glicerofosfolipidele sînt prezente într-o proporţie ridicată în membrane, putînd forma mono- sau duble straturi de lipide (amănunte în capitolul „Structura membranei"), înconjurate de două structuri de proteine. Către proteine se îndreaptă aşa-numitul „cap" hidrofil al fosfolipidelor, iar în interiorul zonei cuprinsă de proteine este „coada" hidrofobă. „Capul" hidrofil este format din radicalul fosforil cu substanţa care-l esterifică (colină, serină, etanolamină etc.) şi din radicalul

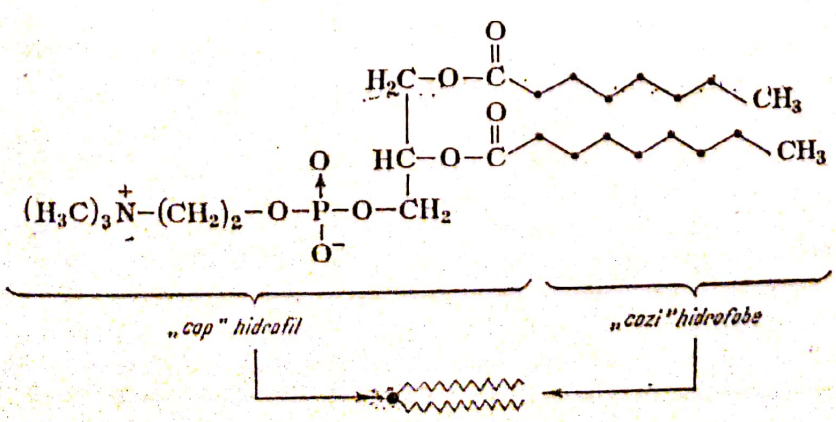
Scanned with OKEN Scanner

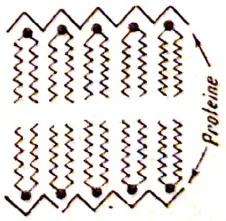
TABELUL 1

Structura acizilor fosfatidici şi formarea glicerofosfolipidelor prin esterificare cu compuşi hidroxilaţi (grupările —OH care se esterifică sînt subliniate)

Acid fosfatidic	Compusul hidroxilat	Glicerofosfolipidul
	 etanolamină (colamină)	Fosfatidiletanolamină (cefalină)
	 trimetilamino-etanol (colină)	Fosfatidilcolină (lecitină)
	 acid α-amino-β-hidroxipropionic (serină)	Fosfatidilserină
	 fosfatidilglicerol	Cardiolipid
	 inozitol	Fosfatidilinozitol

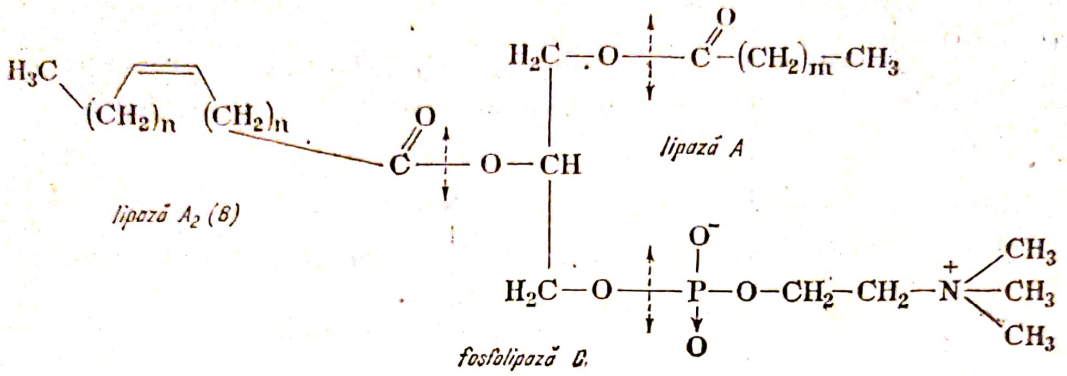
gliceril, în timp ce „coada" hidrofobă este formată din cei doi radicali acil care esterifică glicerolul :





Datorită acestor zone cu afinităţi diferite pentru apă, într-o soluţie apoasă se vor forma filme, pelicule moleculare.

Toţi componenţii fosfatidilcolinei pot fi hidrolizaţi selectiv sub acţiunea unor enzime specifice. Aceste enzime, denumite fosfolipaze sau, după denumirea lor mai veche, lecitinaze, pot desface gruparea acil a acidului gras saturat (fosfolipaza A_1), a acidului gras nesaturat (fosfolipaza A_2 sau B) sau a radicalului fosforil (fosfolipaza C) :



Prin acţiunea lipazei A_2 sau B ia naştere o substanţă care, neavînd acid gras nesaturat în poziţia 2, determină o serie de efecte toxice foarte grave, lezînd membrana eritrocitului. Prin liza acestuia se eliberează hemoglobina, ceea ce face ca transportul de oxigen şi implicit oxigenarea celulelor să fie afectată. Această substanţă se numeşte *lizolecitină* şi se formează în cantităţi mari sub acţiunea lipazelor care se găsesc în veninul unor şerpi ca, de exemplu, crotalul (*Crotalus atrox*) sau cobra (*Naja-naja*). Lizolecitinele sînt hemolizante în anumite condiţii de mediu chiar într-o diluţie de 1/26 000.

Lipaza B se găseşte în organismele animale, putînd scinda unul sau ambii acizi graşi, evident fără a se forma lizolecitinele cu efectele toxice descrise.

Pentru a înţelege cît de perfect sînt coordonate procesele care decurg în organism, amintim că în intestin există o enzimă care poate transfera acidul gras nesaturat din structura fosfatidilcolinei unei alte substanţe, şi anume colesterolului, care va fi esterificat cu acest acid gras. Transferul are însă loc simultan cu o nouă esterificare, evitîndu-se astfel formarea lizolecitinei, fosfatidilcolina servind doar ca donator de grupări acil, şi aceasta din anumite raţiuni energetice, elucidate astăzi pe deplin. Enzima care catalizează acest transfer de grupări acil se numeşte lecitincolesterol-aciltransferaza (LCAT); din punct de vedere medical activitatea acestei enzime are o foarte mare importanţă.

Fosfatidilcolina se găseşte practic în toate celulele, dar în mod special în cele din creier, inimă şi ficat. În afară de rolul structural pe care îl are prin prezenţa sa în structura membranelor celulare, fosfatidilcolina se mai află într-o cantitate apreciabilă în sînge, unită labil cu proteinele serice şi dînd naştere unor lipoproteine, forme de lipide circulante. Rolul metabolic al acestor lipoproteine circulante va fi prezentat ulterior.

Fosfatidiletanolamina (*cefalina*) şi *fosfatidilserina* sînt alţi doi reprezentanţi ai glicerofosfolipidelor. Diferenţele structurale între aceste două

Scanned with OKEN Scanner

substanţe şi fosfatidilcolină constau în natura radicalului care esterifică acidul fosforic şi care, în acest caz, este etanolamina (colamina), respectiv serina.

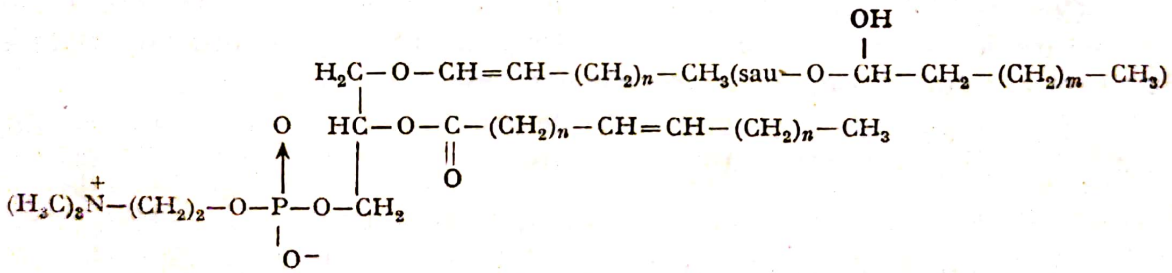
Au proprietăţi şi, evident, roluri metabolice asemănătoare cu fosfatidilcolina, prin urmare un rol plastic, deoarece intră în structura membranelor, şi un rol metabolic. Deşi sînt ionizate, nu se comportă însă ca substanţe amfotere, deosebindu-se prin aceasta de lecitine.

Cardiolipidele sînt formate din două molecule de acizi fosfatidici unite prin intermediul unei molecule de glicerol.

Cardiolipidele intră în componenţa lipidelor din majoritatea tipurilor de celule, dar mai cu seamă în cele ale cordului. Au un rol în procesele serologice care pun în evidenţă prezenţa *Spirochetei palida*, agentul patogen al sifilisului.

Fosfatidilinozitolii sînt substanţe care conţin în structura lor acizi fosfatidici şi inozitol. Au un rol important în transportul acizilor graşi, aşa-numitul efect lipotrop. Sînt răspîndiţi în muşchi, ficat şi inimă. Inozitolul poate fi esterificat cu 1—3 molecule de acid *o*-fosforic, rezultînd mono-, di- sau trifosfaţi ai fosfatidilinozitolului.

Plasmalogenii reprezintă un grup de substanţe diferite oarecum ca structură de cele descrise anterior, deoarece în locul acidului gras saturat care esterifică glicerolul în poziţia α se află o aldehidă cu un număr mare de atomi de carbon, palmitataldehida sau stearataldehida. Compusul care esterifică acidul fosforic poate fi colina, colamina sau serina. Plasmalogenii sînt răspîndiţi în creier, muşchi şi celule nervoase. Datorită prezenţei aldehidei în structura lor, plasmalogenii sînt singurele glicerofosfolipide care dau reacţia Schiff pozitivă (reacţia Feulgen).



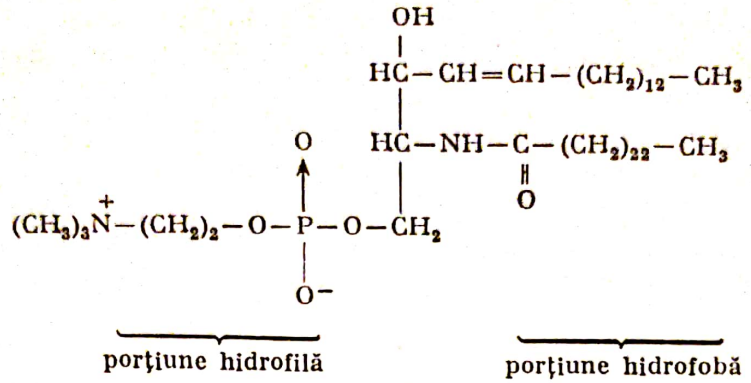
plasmalogen

2.4.2. SFINGOFOSFOLIPIDELE ŞI SFINGOLIPIDELE

Aceste categorii cuprind un număr mare de substanţe, uneori destul de diferite ca structură, în toate fiind însă prezentă sfingozina. Cel mai simplu compus ale acestei grupe este *cerazina*, o substanţă care conţine un radical acil legat la gruparea amino a sfingozinei, deci este o amidă a sfingozinei cu un acid gras. Importanţa acestei substanţe este minoră, fiind de fapt un intermediar al sintezelor altor reprezentanţi ai acestei clase.

Sfingomielina este principalul reprezentant al acestei clase; este formată din sfingozină substituită la gruparea amino cu un acid gras, de obicei unul din următorii acizi : *nervonic* (24 : 1 ; Δ 14), *cerebronic* (α-hidroxiacid cu 24 atomi carbon) sau *lignoceric* (24 atomi carbon); toţi aceştia au,

după cum se poate vedea, 24 atomi de carbon. Gruparea —OH terminală a sfingozinei este esterificată cu fosfocolina :



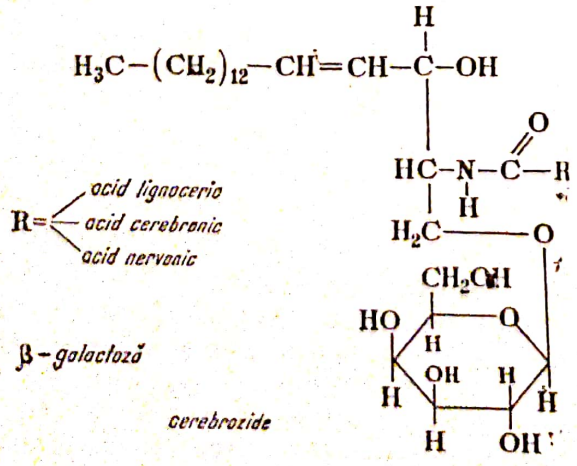
sfingomielină

Conformaţional, sfingomielina este asemănătoare cu fosforilcolina, avînd ca şi aceasta o porţiune hidrofilă şi una hidrofobă ; este o substanţă foarte răspîndită în organismele animale, găsindu-se liberă în diverse structuri, de exemplu în membrana celulelor sau în teaca de mielină a cilindrilor din axoni.

Acumularea excesivă a sfingomielinei în ţesutul nervos, datorită unui defect genetic, determină grave tulburări metabolice, cunoscute sub numele de boala lui N i e m a n n - P i c k.

Cerebrozidele sînt alţi reprezentanţi ai acestei clase, care conţin în structura lor o oză şi anume β-galactoză, de unde şi denumirea care se mai dă acestor substanţe — *cerebrogalactozide.*

Acizii graşi care se leagă amidic de gruparea amino a sfingozinei sînt tot cei întîlniţi în structura sfingomielinei, şi anume acizii lignoceric, cerebronic şi nervonic. Cerebrozidele sînt întîlnite în structura membranelor celulare şi în structura ţesutului nervos, mai ales în creier. Înlocuirea galactozei cu glucoza, în urma unei defecţiuni enzimatice de natură genetică, determină o acumulare a acestui cerebrozid anormal mai ales în celulele reticuloendoteliale ale splinei, determinînd o serie de manifestări patologice cunoscute sub numele de boala lui G a u c h e r.

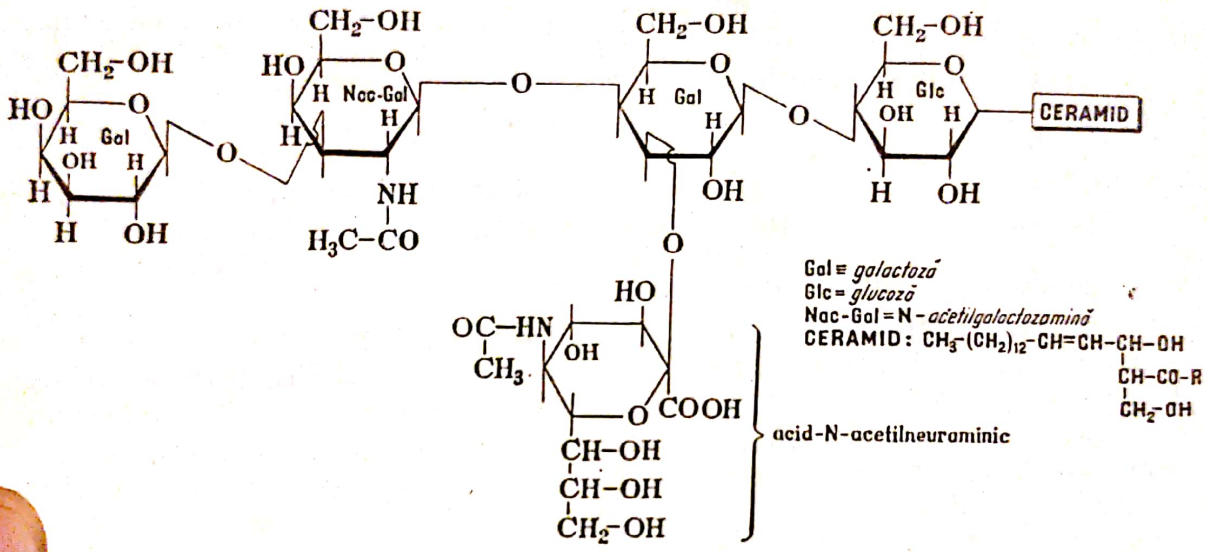


Cerebrosulfatidele sînt derivaţi ai cerebrozidelor care au hidroxilul de la C_6 al galactozei esterificat cu acidul sulfuric. Au un rol biologic mai puţin precizat.

Scanned with OKEN Scanner

Gangliozizii constituie un grup de substanţe cu structură complexă, care se aseamănă într-o oarecare măsură cu aceea a părţii glucidice din glicoproteine. În structura gangliozizilor au fost identificate următoarele substanţe : acizi graşi, sfingozină, glucoză, galactoză, N-acetilglucozamină şi acid N-acetilneuraminic (acizi sialici).

Una dintre secvenţele cunoscute de gangliozizi are următoarea structură :



2.4.3. ROLUL BIOLOGIC GENERAL AL FOSFOLIPIDELOR

Glicerofosfolipidele şi sfingolipidele pot exista în organismele animale sub formă liberă sau sub forma unor complexe lipoproteice, proteina legîndu-se de componenta lipidică, cel mai adesea ionic sau coordinativ, deci labil.

Fosfolipidele au un rol energetic redus, principalul lor rol fiind cel structural, deoarece intră atît în compoziţia membranelor celulare şi a unor formaţiuni subcelulare, cît şi în cea a sistemului nervos. Rolul acesta este atît de mare încît, chiar în timpul unei inaniţii prelungite, concentraţia lor celulară nu se modifică.

Fosfolipidele au şi un rol metabolic, un mare număr dintre ele fiind activatori enzimatici, în special ai enzimelor localizate în membrana mitocondrială unde are loc fosforilarea oxidativă, proces prin care se obţine cea mai mare cantitate de energie, şi care este dependentă de integritatea membranei.

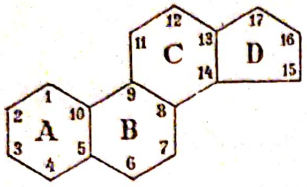
Menţionăm şi un alt rol, acela de a forma complexe cu proteinele serice, putînd constitui aşa-numitele forme lipidice circulante.

Scanned with OKEN Scanner

2.5. STERIDELE

Sînt o clasă de lipide simple rezultate prin esterificarea unor alcooli ciclici, în general superiori, saturaţi sau nesaturaţi.

Sterolii au la baza structurii o hidrocarbură saturată, *steranul*, care este un ciclopentanoperhidrofenantren. Notarea ciclurilor şi numerotarea atomilor de carbon, care se menţine şi în steroli, este dată în următoarea formulă :



ciclopentanoperhidrofenantren

Toţi sterolii prezintă drept caracteristică structurală comună prezenţa în poziţiile **10** şi **13** a cîte unui radical metil, numiţi metil angulari, o grupare alcoolică în poziţia **3** şi o catenă hidrocarbonată în poziţia **17**.

Se diferenţiază structural prin numărul şi poziţia dublelor legături în ciclul *B*, prin numărul de atomi de carbon şi prezenţa sau absenţa unei legături duble în catena din poziţia **17**.

Prezenţa grupării alcoolice în poziţia **3** creează un centru de asimetrie. Poziţia hidroxilului se determină în raport cu metilul C_{10}, care se află la toţi sterolii naturali deasupra planului moleculei, perpendicular pe acesta.

Dacă gruparea alcoolică se află de aceeaşi parte cu metilul de la C_{10}, compusul este un izomer *cis* numit β şi are covalenţa notată prin linie continuă, iar dacă este de partea opusă faţă de acest metil, configuraţia este *trans* numită şi α şi are covalenţa notată prin linie discontinuă.

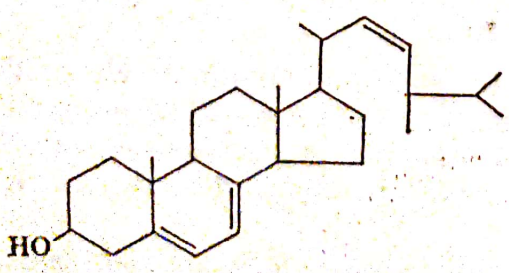
Sterolii sînt larg răspîndiţi în natură şi se cunoaşte o clasificare a acestora în :

— *fitosteroli*-steroli specifici regnului vegetal, mai importanţi fiind *sitosterolul* şi *stigmasterolul* ;

— *micosteroli*, sintetizaţi de ciuperci, cu reprezentantul de bază *ergosterolul* ;

— *zoosteroli*, cel mai important fiind *colesterolul*.

Ergosterolul, izolat dintr-o ciupercă a bobului de secară, prezintă importanţă pentru organismul uman fiind provitamină D_2, deoarece sub acţiunea radiaţiilor ultraviolete se transformă în această vitamină (vezi „Vitamine"). Se diferenţiază structural de colesterol prin prezenţa unei duble legături suplimentare în nucleul *B* (în poziţia **7,8**), prin prezenţa unei duble legături în catena hidrocarbonată în poziţia **20-21** şi a unui metil în poziţia **23:**

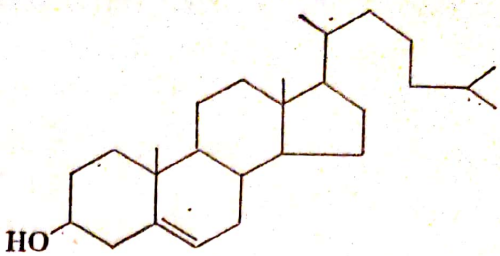


ergosterol

Colesterolul reprezintă cel mai important sterol pentru organismul uman. Structura sa se caracterizează prin prezenţa unei duble legături în nucleul *B* în poziţia **5,6** şi a unei catene hidrocarbonate saturată în poziţia **17**, alcătuită

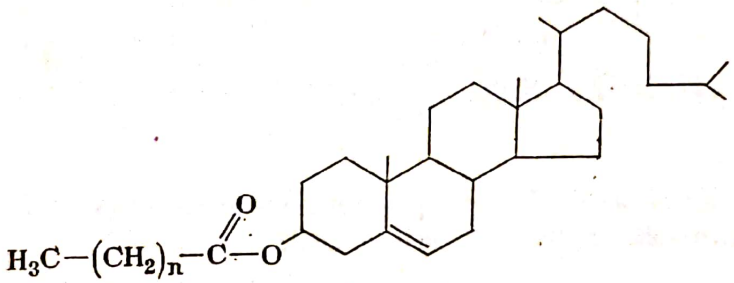
din opt atomi de carbon, cu un radical izopropil la extremitate.

Prezenţa acestui sterol în organism este asigurată atît prin dietă, cît şi prin biosinteză, care se desfăşoară foarte activ la nivelul ficatului în special, apoi în glandele suprarenale, iar în proporţii mai reduse în toate ţesuturile.



colesterol

Se găseşte atît în stare liberă, cît şi esterificat cu acizi graşi superiori saturaţi şi nesaturaţi, această fracţiune fiind denumită colesterol esterificat:



colesterol esterificat

În sînge se află în proporţie de 150—250 mg/100 ml, o treime liber şi 2/3 esterificat şi circulă sub formă de complexe lipoproteice, aflîndu-se în concentraţie mai mare în fracţiunea β-lipoproteică.

Importanţa colesterolului pentru organismul uman rezultă din multiplele roluri pe care le îndeplineşte şi anume:

— face parte din structura membranelor, participînd la fenomenele de transport la nivelul acestora;

— este provitamină D_3, deoarece prin iradiere cu lumină ultravioletă se transformă în această vitamină (vezi „Vitamine")

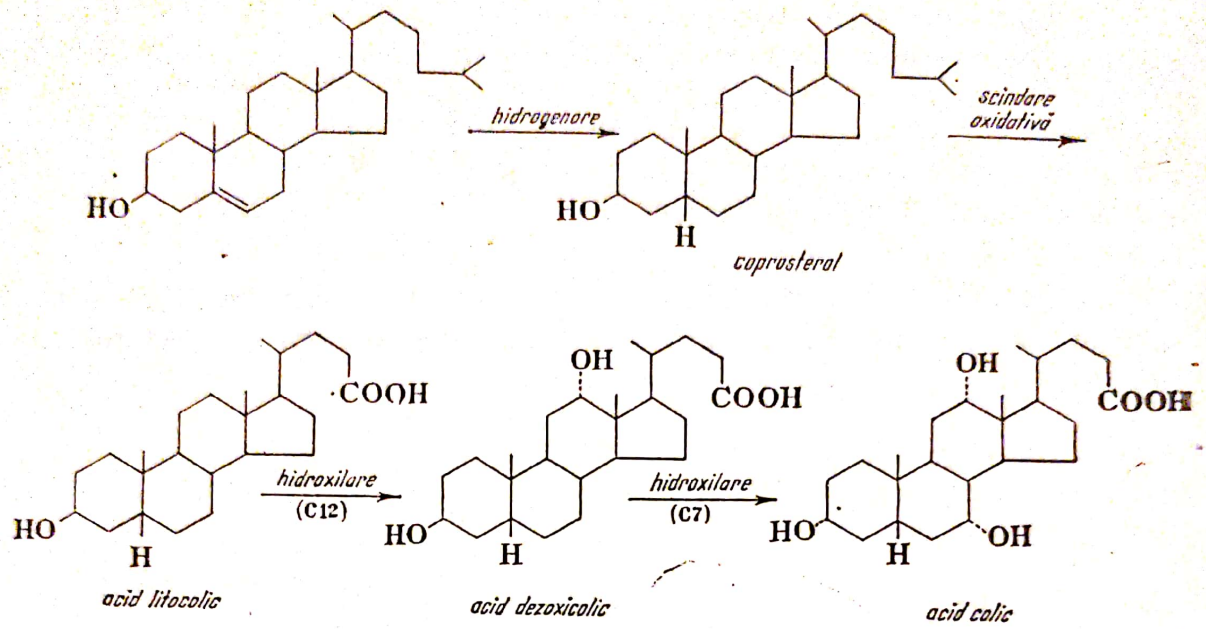
— are rol antihemolitic şi antitoxic, putîndu-se combina cu diverse hemolizine sau substanţe toxice;

— prin scindarea oxidativă a catenei la nivelul C_{20} rezultă Δ 5-pregnenolon, intermediar comun în sinteza hormonilor steroizi cortico-suprarenali şi sexuali;

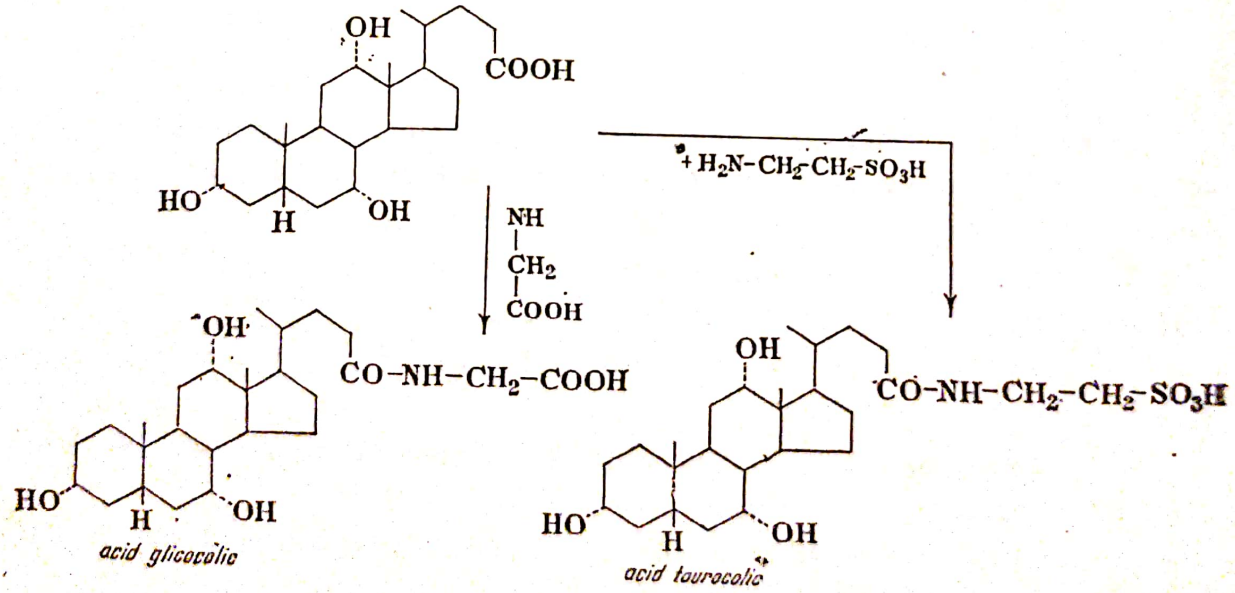
— 70—80 % din colesterolul hepatic este transformat, prin saturarea cu hidrogen a dublei legături din poziţia 5,6 şi scindarea oxidativă a catenei la nivelul carbonului 22, în *acid colanic* care dă, prin reacţii de hidroxilare în

Scanned with OKEN Scanner

poziţiile 3, 12, 7, *acizi colici* şi anume :



Acidul colic se amidifică cu glicocolul sau taurina şi formează acidul glicocolic şi taurocolic, numiţi acizi biliari :



Aceşti doi acizi, sub formă de săruri de sodiu sau potasiu, realizînd un circuit entero-hepatic, îşi exercită rolul în digestia şi absorbţia lipidelor şi componentelor liposolubile. Acest rol este asigurat atît prin activarea lipazelor intestinale, cît şi datorită proprietăţii tensioactive a acestor săruri ceea ce permite emulsionarea grăsimilor dietetice în intestin, mărind astfel suprafaţa de acţiune a lipazelor digestive.

Scanned with OKEN Scanner

3 PROTEINE ŞI HETEROPROTEINE

3.1. DEFINIŢIE, CLASIFICARE, ROL BIOLOGIC

Produşii naturali cu structură macromoleculară care prin hidroliză eliberează α-aminoacizi poartă numele de *proteine* sau *holoproteine*. Dacă se ţine cont de structura celor 22 de aminoacizi eliberaţi prin hidroliză, compoziţia elementară a proteinelor va consta din carbon, hidrogen, oxigen, azot şi sulf.

Acei produşi naturali care prin hidroliză eliberează alături de aminoacizi şi o componentă de natură neproteică poartă numele de *heteroproteine* (*proteide*, *proteine conjugate*). Componenta neproteică este numită curent *grupare prostetică*. Alături de elementele conţinute de proteine, heteroproteinele conţin, după caz, multe alte elemente ca de exemplu : fosfor, halogeni, fier, cupru etc.

Holoproteinele sînt divizate în două grupe mari, diferenţiate prin insolubilitatea sau gradul lor de solubilitate într-un mediu apos. Proteinele solubile în apă alcătuiesc grupa *proteinelor globulare*. Numeroasele proteine care intră în această grupă pot, la rîndul lor, să se asemene din punct de vedere al structurii şi al proprietăţilor chimice şi biologice cu una din cele patru proteine tipice, încadrîndu-se astfel în grupa *protaminelor*, *histonelor*, *albuminelor* sau *globulinelor*.

În grupa protaminelor se încadrează proteinele cu masă moleculară mai mică, cu un caracter net bazic şi care nu se denaturează la căldură, fiind aşadar termostabile.

Proteinele care se aseamănă cu histonele au un caracter bazic mai puţin pronunţat decît al protaminelor, dar cu mase moleculare mai mari, fiind termolabile.

Albuminele, proteine cu caracter acid, mase moleculare cuprinse între 35 000 şi 100 000 şi termolabile alcătuiesc, împreună cu globulinele, care au mase moleculare mai mari, dar şi un caracter mai puţin acid decît al albuminelor, grupele în care se încadrează majoritatea proteinelor.

Încadrarea aceasta a proteinelor în patru grupe este arbitrară, dar necesară, fiind singurul criteriu care permite o clasificare a numeroaselor proteine din organism.

Denumirea de proteine globulare, ca dealtfel şi aceea de *proteine fibrilare* — cea de a doua clasă de proteine — se referă la anumite caracteristici structurale, care vor fi prezentate ulterior.

Proteinele fibrilare sînt proteine de structură, rezistente la tracţiune şi care se împart în :

— proteine greu solubile în apă, solubile în soluţii saline concentrate, în care se încadrează *fibrinogenul* (proteină serică cu rol în coagulare), *miozina* şi *actina* (proteine cu rol contractil localizate în muşchi) ;

— proteine insolubile în apă, ca *scleroproteinele*, *keratinele* (care se găsesc în păr, unghii, piele), *colagenul* şi *elastina* (localizate în tendoane, cartilagii, matricea osului, ţesutul conjunctiv).

Solubilitatea limitată în apă a fibrinogenului, miozinei şi actinei se datoreşte faptului că aceste proteine conţin în anumite porţiuni ale moleculei lor structuri asemănătoare proteinelor globulare. Aceste proteine constituie de fapt o categorie de proteine intermediare între cele globulare şi cele fibrilare, avînd caracteristici structurale tipice atît proteinelor globulare, cît şi celor fibrilare.

În ceea ce priveşte clasificarea heteroproteinelor, aceasta se face în funcţie de natura grupării prostetice. Se disting astfel :

— *cromoproteine* (conţin hem, porfirină) ;
— *glicoproteine* (galactoză, maltoză) ;
— *mucopolizaharide* (acizi uronici, glucozamină) ;
— *nucleoproteine* (acizi ribo- şi dezoxiribonucleici) ;
— *lipoproteine* (colesterol, fosfolipide, trigliceride) ;
— *metaloproteine* (Fe^{2+}, Fe^{3+}, Cu^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}, Mg^{2+}).

Fiecare dintre aceste clase de heteroproteine are mai mulţi reprezentanţi care se clasifică după criterii ce vor fi arătate la descrierea lor.

Nici glucidele şi nici lipidele nu au diversitatea funcţională a proteinelor, fapt care a făcut ca acestea să ocupe dintotdeauna o poziţie prioritară în biologie. Totuşi numai de relativ puţină vreme a fost posibil să se precizeze rolul lor real în angrenajul general de procese ce definesc acea stare specială care reprezintă viaţa. Rolul jucat de proteine a fost definit cu mare greutate, deoarece proteinele constituie edificii moleculare complexe, biomolecule greu de separat unele de altele şi de adus în stare pură datorită, pe de o parte, labilităţii lor, iar pe de alta faptului că în celule şi medii biologice se găsesc cîteva zeci, sute sau chiar mii de proteine diferite.

După funcţiile pe care le îndeplinesc în organismele vii, proteinele şi proteidele se pot împărţi în patru grupe distincte şi anume :

— Proteine cu rol metabolic, de catalizator. Rolul cel mai important îl deţin, în cazul acesta, enzimele, proteine cu structură globulară în marea majoritate a cazurilor, şi care au capacitatea de a cataliza reacţiile chimice din organism. Astăzi sînt cunoscute aproximativ 2 000 de enzime care catalizează reacţii specifice. În categoria aceasta pot fi incluse şi proteinele cu activitate hormonală, ca insulina sau hormonii secretaţi de hipofiză.

— Proteine structurale, cu rol în contracţia musculară, aşa cum sînt miozina şi actina, ca şi cele de susţinere, aflate în păr, unghii, piele, ten-

doane, țesut conjunctiv. Din punct de vedere al cantității, proteinele din grupa aceasta constituie majoritatea proteinelor din organism.

— Proteine de protecție, care au rolul de a proteja organismul de diverse acțiuni ce pot tulbura unele aspecte metabolice. În această categorie sînt incluse proteinele cu rol în imunitate, ca și cele care determină coagularea sîngelui. În primul caz este vorba de γ-globuline, iar în al doilea de trombină și de fibrinogen.

— Proteine cu funcție de transport : gaze (ca hemoglobina pentru oxigen), ioni (ca siderofilina pentru fier și ceruloplasmina pentru cupru), lipide (ca diverse globuline serice sau albumina).

Clasificarea aceasta nu este, bineînțeles, completă, dar ajută la intuirea rolului biologic primordial al proteinelor.

Diversității funcțiilor biologice îndeplinite de proteine îi corespund structuri complexe. Privind proteinele comparativ cu glucidele și lipidele se observă că în toate glucidele, inclusiv în polizaharide, nu se întîlnesc mai mult de două-trei unități structurale (monozaharide) diferite legate între ele, situație care se constată și la lipide. Nu același lucru se poate spune și despre proteine, biomolecule alcătuite din lanțuri lungi, rezultate prin condensarea celor 22 de aminoacizi. Privind superficial, un neavizat poate considera totuși că acest număr e mic și că nu poate explica enorma diversitate a proteinelor. Luînd însă în considerație faptul că în fiecare proteină cei 22 de aminoacizi se înlănțuiesc într-o ordine anumită, diferită de la proteină la proteină, că raportul procentual al celor 22 de aminoacizi depinde de tipul de proteină și că, în sfîrșit, numărul total al aminoacizilor care constituie lanțul proteinei respective este de asemenea diferit, ne putem da seama că, practic, numărul de proteine este nelimitat. Pentru a sublinia cele expuse mai sus, se apreciază că într-o singură bacterie — organism molecular — există aproximativ 3 000 de proteine diferite, în timp ce omul are mai mult de 5 milioane de proteine complet diferite. Dacă se mai adaugă și faptul că proteinele diferă de la specie la specie, numărul acestora fiind estimat la peste un milion de organisme diferite, se poate trage concluzia că numărul total al proteinelor din natură se ridică la o cifră enormă.

3.2. AMINOACIZII

3.2.1. STRUCTURA AMINOACIZILOR

Prin hidroliza acidă, alcalină sau enzimatică a proteinelor se pun în libertate aminoacizii care au participat la structura moleculei proteice respective. Deși se cunosc aproximativ 150 de aminoacizi, dintre care o parte sînt prezenți și în organismul uman, numai un număr de 22 iau parte la formarea tuturor structurilor proteice.

Toți cei 22 de aminoacizi au o serie de caracteristici structurale comune, și anume :

— gruparea lor amino este în poziția α, sînt deci α-aminoacizi ; se pot nota ca excepții, prolina și hidroxiprolina, doi aminoacizi la care gruparea amino este inclusă într-un ciclu pirolic ;

Scanned with OKEN Scanner

— cu o singură excepţie (glicocolul), toţi aminoacizii conţin cel puţin un atom de carbon asimetric şi au deci activitate optică, rotind planul luminii polarizate spre dreapta — dextrogiri (+) — sau spre stînga — levogiri (—);

— toţi aminoacizii au gruparea aminică îndreptată spre stînga faţă de poziţia ocupată de gruparea carboxilică, sînt deci *L*-aminoacizi (de reamintit că monozaharidele aparţin seriei *D*);

— prezenţa simultană a celor două grupări, carboxilică şi amino, învecinate spaţial, conferă acestei clase de substanţe o serie de proprietăţi care au făcut ca prin unirea lor să poată fi posibilă formarea biomoleculelor cu semnificaţia biologică pe care o au proteinele.

3.2.2. PROPRIETĂŢILE FIZICO-CHIMICE PRINCIPALE ALE AMINOACIZILOR

3.2.2.1. *Proprietăţi fizice*: aminoacizii sînt substanţe cristaline, albe, majoritatea lor fiind solubile în apă. Cei mai insolubili aminoacizi la un *p*H neutru sînt cisteina şi tirozina; ambii se solvă însă în mediu acid sau alcalin.

Echilibrul proteic al aminoacizilor se referă la asociaţia sau disociaţia protonilor într-o substanţă dată. Priviţi din acest punct de vedere, acizii se consideră a fi donatori de protoni, în timp ce bazele sînt acceptoare de protoni. Astfel:

$$\text{acid} \rightleftharpoons \text{bază} + H^+$$

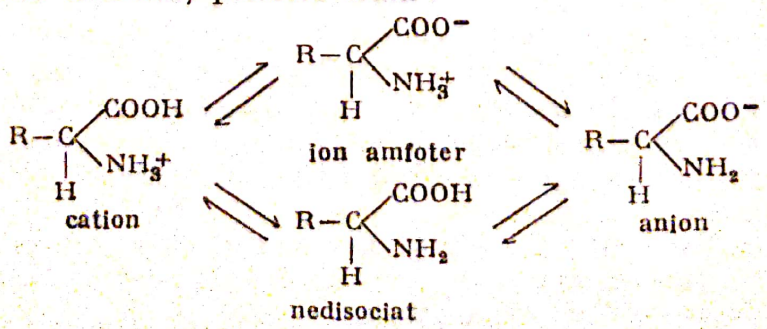
Fiecărui acid îi va corespunde o bază conjugată, existînd un echilibru protonic, un schimb protonic care corespunde ecuaţiei generale:

$$\text{acid}_1 + \text{bază}_2 \rightleftharpoons \text{bază}_1 + \text{acid}_2$$

În acest context, un *amfolit* (o substanţă amfoteră) este un compus care posedă atît proprietăţi acide, cît şi bazice, dependente de proprietăţile fizico-chimie ale mediului respectiv; din această categorie face parte şi apa:

$$2\ H_2O \rightleftharpoons H_3O^+ + OH^-$$

Aminoacizii, datorită prezenţei simultane în structura lor a cel puţin unei grupări amino şi a cel puţin unei grupări carboxilice, se vor comporta fie ca acizi slabi, fie ca baze slabe, comportare determinată de *p*H-ul soluţiei. Într-o soluţie apoasă coexistă patru forme, într-un raport cantitativ dependent de natura mediului, dar în care forma nedisociată este prezentă într-o cantitate minimă, practic nulă:



Anionul, cationul sau ionul amfoter nu se găsesc ca entități individuale, ci numai în prezența unui alt ion cu sarcină opusă :

$$\text{acid} + H_2O \rightleftharpoons H_3O^+ + \text{bază}$$

$$\text{bază} + H_2O \rightleftharpoons \text{acid} + OH^-$$

sau scoțînd în evidență în mod separat grupările carboxilice, respectiv aminice ale aminoacizilor :

$$R-COOH + H_2O \rightleftharpoons R-COO^- + H_3O^+$$

$$R-NH_2 + H_2O \rightleftharpoons R-NH_3^+ + OH^-$$

Disocierea acidă sau bazică va fi dependentă de cite o constantă K_a sau K_b care, conform legii acțiunii maselor, va fi egală cu :

$$K_a = \frac{[R-COO^-]\,[H_3O^+]}{[R-COOH]\,[H_2O]}$$

$$K_b = \frac{[R-NH_3^+]\,[OH^-]}{[R-NH_2]\,[H_2O]}$$

Atunci cînd $[R-COO^-] = [R-COOH]$

sau

$$[R-NH_3^+] = [R-NH_2]$$

$K = [H^+]$ și deci $-\log K = -\log [H^+]$

$$pK = pH$$

deci pK este pH-ul la care ambele grupări disociate au concentrații egale, se neutralizează reciproc, și se va numi pH-ul izoelectric (pH$_i$), reprezentînd o constantă a fiecărui aminoacid, constantă care depinde de numărul

TABELUL 2

Valorile pK ale grupărilor $-COOH$ și $-NH_2$ și ale pH$_i$ ale unor aminoacizi

Aminoacizii	pK_a ($-COOH$)	pK_b ($-NH_2$)	pH_i
Asp	2,09	9,82	2,93
Glu	2,19	9,67	3,21
Ser	2,21	9,15	5,42
Gly	2,34	9,60	6,10
Ala	2,34	9,69	6,81
Lys	2,18	8,95	9,93
Arg	2,17	9,04	10,85

de grupări amino sau carboxilice pe care le conțin aminoacizii respectivi (tab. 2).

La pH$_i$ solubilitatea aminoacizilor și implicit a proteinelor va fi minimă, putînd chiar precipita, iar migrarea într-un cîmp electric va fi nulă.

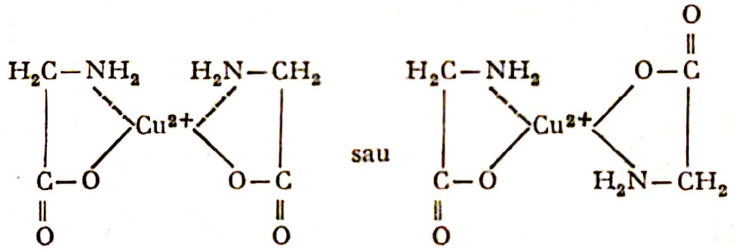
Scanned with OKEN Scanner

Într-o soluţie cu *p*H diferit de *p*H$_i$ atît aminoacizii, cît şi proteinele vor avea o anumită încărcare electrică, pozitivă sau negativă, ceea ce va face să migreze într-un cîmp electric spre anod sau spre catod, deci va permite separarea lor dintr-un mediu care conţine mai mulţi aminoacizi, respectiv proteine. Tehnica corespunzătoare se numeşte electroforeză. Pe acelaşi principiu se bazează şi cromatografia cu schimbători de ioni, des utilizată în separarea aminoacizilor şi proteinelor.

3.2.2.2. *Proprietăţile chimice generale* ale aminoacizilor se pot datora grupărilor funcţionale amino, carboxil sau ambelor.

3.2.2.2.1. *Proprietăţi chimice datorate ambelor grupări.* — Prin reacţia grupării carboxilice cu cea aminică, doi aminoacizi se pot uni între ei formînd un dipeptid care, în continuare, se poate uni în acelaşi mod cu încă un aminoacid, şi aşa mai departe, obţinîndu-se oligo- şi polipeptide. Procesul de sinteză a peptidelor, care a fost realizat şi în laborator, are corespondent în organism un proces de biosinteză, proces extrem de complex şi de fin, reglat de sisteme care controlează în mod riguros toate etapele care se parcurg.

— Aminoacizii pot forma săruri complexe cu o serie de ioni, printre care citäm ionii de cupru, nichel, cadmiu. Aceste săruri sînt colorate şi pot servi la diverse reacţii de recunoaştere.



3.2.2.2.2. *Proprietăţi chimice datorate grupării carboxil.* — Aminoacizii se pot decarboxila, formîndu-se aminele respective, dintre care unele sînt de o importanţă biologică deosebită. Acest proces se poate realiza chimic, el are însă loc în mod curent în toate organismele, fiind catalizat şi controlat de o serie de enzime specifice. Dintre aminele biogene importante amintim *histamina*, *tiramina*, *triptamina* etc. De asemenea, sub acţiunea unor enzime pe care le conţin bacteriile de putrefacţie, se pot forma amine toxice ca *putresceina* şi *cadaverina*

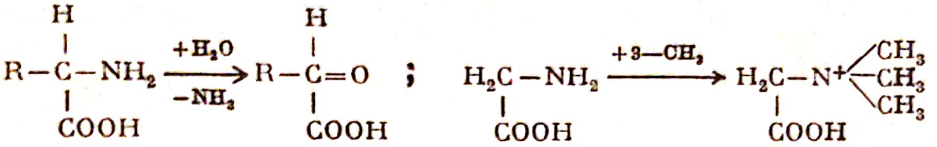
— Formarea de amide constituie un alt proces de mare importanţă biologică şi care are loc în mod continuu în organism. De altfel, două dintre principalele amide ale organismului, *glutamina* şi *asparagina*, formate din acizii glutamic şi aspartic, sînt şi constituenţi ai unor proteine.

— Ca orice acizi, şi aminoacizii pot forma cu alcoolii esteri, reacţie folosită iniţial la identificarea aminoacizilor din proteine, datorită faptului că au puncte de fierbere specifice.

3.2.2.2.3. *Proprietăţi chimice datorate grupării amino.* — Prin dezaminarea aminoacizilor se formează în organism cetoacizi, intermediari metabolici de mare importanţă. Prin această reacţie catalizată enzimatic, se formează simultan şi amoniac.

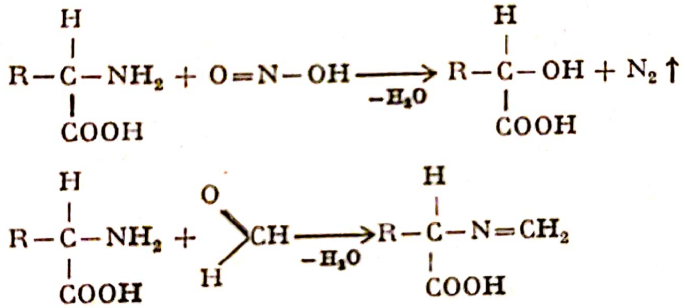
Scanned with OKEN Scanner

— Atît în laborator, cît şi în organism gruparea amino se poate metila, formîndu-se derivaţii metilaţi respectivi. În laborator reacţia are loc în prezenţa iodurii sau a sulfatului de metil, iar *in vivo* sub acţiunea metilantă a unei substanţe specializate pentru această reacţie, şi anume *metionina activată* sau *S-adenozilmetionina*. Prin metilarea glicocolului se formează *betaina*, substanţă care, la rîndul ei, poate fi donatoare de grupări metil :

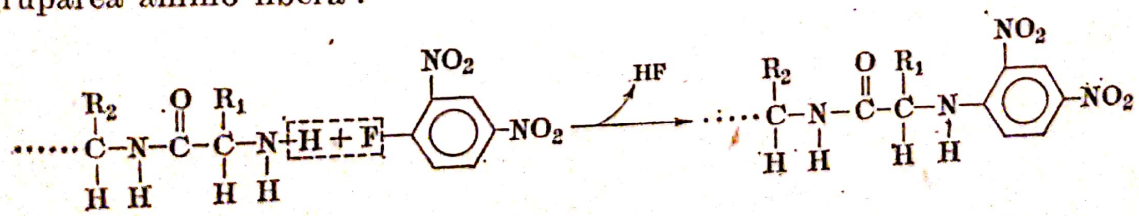


— Sub acţiunea acidului azotos, aminoacizii se transformă în oxiacizii respectivi, punîndu-se în libertate azot, care se poate doza cantitativ. Această reacţie reprezintă principiul metodelor de dozare cantitativă a aminoaciziilor, metoda Van Slyke.

— Sub acţiunea aldehidei formice se produce o blocare a grupării amino, ceea ce permite titrarea grupării carboxil rămasă liberă. Această reacţie reprezintă metoda denumită a formol-titrării, elaborată de către Sörensen :



— Sub acţiunea **1**-fluoro-**2,4**-dinitrobenzenului se formează derivaţii dinitrofenilaţi ai aminoacizilor respectivi, compuşi de culoare galbenă, care pot fi separaţi şi identificaţi cromatografic. Această reacţie, întrebuinţată pentru prima oară de Sanger în cercetările sale privind stabilirea structurii insulinei, pe care a şi elucidat-o de altfel în 1956, i-a permis acestuia să identifice aminoacizii N-terminali, deci cei care au gruparea amino liberă :



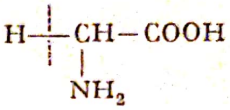
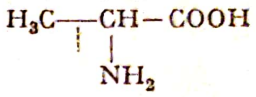
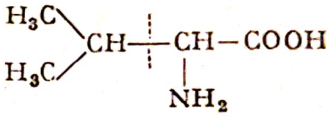
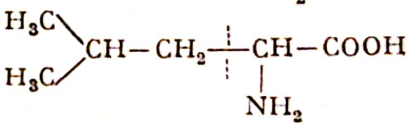
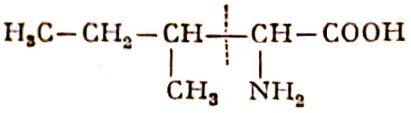
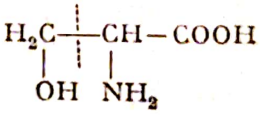
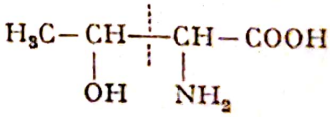
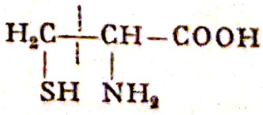
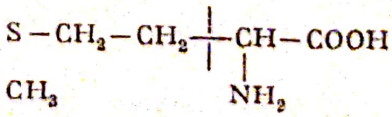
3.2.3. CLASIFICAREA AMINOACIZILOR IDENTIFICAŢI IN PROTEINE

Din punct de vedere structural cei 22 de aminoacizi care intră în structura proteinelor pot fi împărţiţi în 7 grupe.

Aminoacizii cei mai simpli derivă din acizi organici la care în poziţia α se găseşte o grupare amino. Principalii acizi organici de la care

TABELUL 3

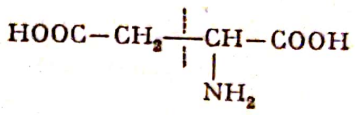
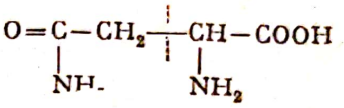
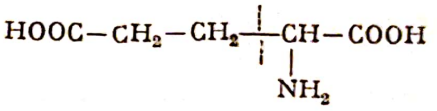
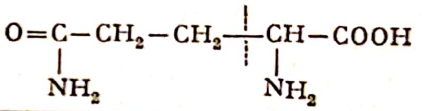
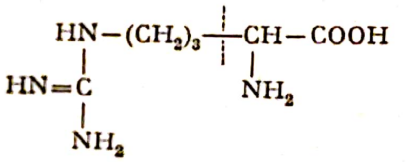
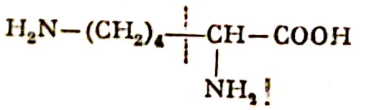
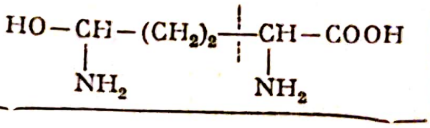
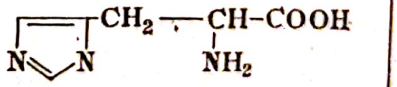
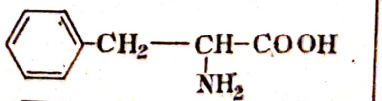
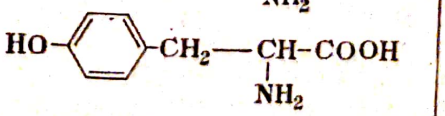
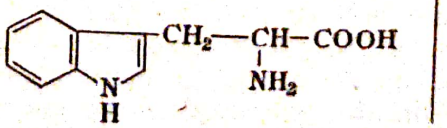
Clasificarea şi unele caracteristici ale aminoacizilor identificaţi în proteine

Nr. crt.	Aminoacidul	Denumirea chimică	Formula chimică	Radicalul
		Grupa I. Aminoacizi cu lanţ alifatic		
1	Gly	acid α-aminoacetic		R_h*
2	Ala	acid α-amino-propionic		R_h
3	Val	acid α-amino-izovalerianic		R_h
4	Leu	acid α-amino-izocaproic		R_h
5	Ileu	acid α-amino-β-metil-valerianic		R_h
		Grupa II. Aminoacizi cu grupări hidroxil		
6	Ser	acid α-amino-β-hidroxipropionic		R_p
7	Thre	acid α-amino-β-hidroxibutiric		R_p
		Grupa III. Aminoacizi cu sulf		
8	Cys	acid α-amino-β-mercapto-propionic		R_p
9	Met	acid α-amino-γ-metiltiobutiric		R_p

*R_h = radical hidrofob
R_p = radical polar neîncărcat electric
R_{pa} = radical polar cu caracter acid
R_{pb} = radical polar cu caracter bazic

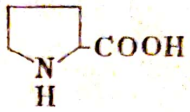
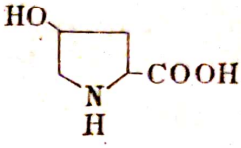
Scanned with OKEN Scanner

TABELUL 3 (continuare)

Nr. crt.	Aminoacidul	Denumirea chimică	Formula chimică	Radicalul
	Grupa IV. Aminoacizi monoaminodicarboxilici și amidele lor			
10	Asp	acid α-aminosuccinic		R_{pa}
11	Asn	amida acidului α-aminosuccinic		R_p
12	Glu	acid α-aminoglutaric		R_{pa}
13	Gln	amida acidului α-aminoglutaric		R_p
	Grupa V. Aminoacizi diaminomonocarboxilici			
14	Arg	acid α-amino-δ-guanidovalerianic		R_{pb}
15	Lys	acid α,ε-diamino-caproic		R_{pb}
16	HO—Lys	acid α,ε-diamino-ε-hidroxicaproic		R_{pb}
	Grupa VI. Aminoacizi ciclici			
17	His	acid α-amino-β-imidazolpropionic		R_p
18	Phe	acid α-amino-β-fenilpropionic		R_h
19	Tyr	acid α-amino-β-para-hidroxifenilpropionic		R_p
20	Try	acid α-amino-β-indol-propionic		R_h

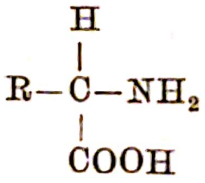
Scanned with OKEN Scanner

TABELUL 3 (continuare)

Nr. crt.	Aminoacidul	Denumirea chimică	Formula chimică	Radicalul
	Grupa VII. Aminoacizi cu ciclu imidazolic			
21	Pro	acid pirolidon-2-carboxilic		R_h
22	HO-Pro	acid 4-hidroxipirolidon-2-carboxilic		R_p

provin aminoacizii sînt cei cu 2, 3, 4, 5, 6 atomi de carbon şi care se numesc, în ordine, acetic, propionic, butiric, valerianic, caproic. Începînd de la primul atom de carbon după cel al grupării carboxilice se face şi o notare cu litere greceşti. Astfel, atomii de carbon **2**, **3**, **4**, **5** şi **6** vor fi notaţi α, β, γ, δ, şi ξ, notaţie deosebit de importantă pentru precizarea diverşilor radicali.

Se observă că toţi aminoacizii, cu excepţia prolinei şi a hidroxiprolinei, au următoarea formulă generală; în tabelul **3** se dă formula com-



pletă a primului amino-acid din fiecare grupă, pentru ceilalţi dîndu-se radicalul. Astfel apar şi mai clar diferenţele structurale.

— În funcţie de caracterul polar sau nepolar al radicalilor există patru categorii de aminoacizi, şi anume :

a) aminoacizi cu grupări nepolare sau hidrofobe; aceşti aminoacizi sînt mai puţin solubili în apă decît aminoacizii polari;

b) aminoacizi cu grupări polare neîncărcate electric, doar puţin ionizate la *p*H-ul fiziologic;

c) aminoacizi cu grupări polare încărcate electronegativ, avînd deci un caracter acid;

d) aminoacizi cu grupări polare încărcate electropozitiv, avînd deci un caracter bazic.

Aceste caracteristici polare sînt de o mare importanţă pentru structura şi proprietăţile chimico-fizice şi biochimice ale proteinelor. În tabelul de mai sus sînt prezentate cele 7 grupe de aminoacizi cu caracteristicile mai sus amintite (tab. 3).

3.2.3.1. *Aminoacizii esenţiali* nu pot fi sintetizaţi de către organism, aşa că este absolut necesară introducerea lor prin alimentaţie; din această categorie fac parte următorii 8 aminoacizi : valina, leucina, izoleucina, treonina, metionina, lizina, triptofanul şi fenilalanina. Lipsa acestor aminoacizi din alimentaţie determină o serie de tulburări foarte grave.

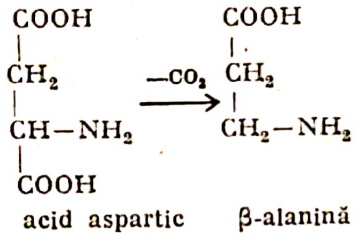
Scanned with OKEN Scanner

Toţi cei 22 de aminoacizi trebuie să se găsească în mod continuu în organismele animale pentru sinteza proteinelor lor specifice. O parte din cei 22 de aminoacizi pot fi sintetizaţi în organism printr-o serie de reacţii care au ca puncte de plecare diverşi metaboliţi; ei sînt numiţi aminoacizi endogeni.

3.2.4. AMINOACIZI CARE NU INTRĂ ÎN STRUCTURA PROTEINELOR

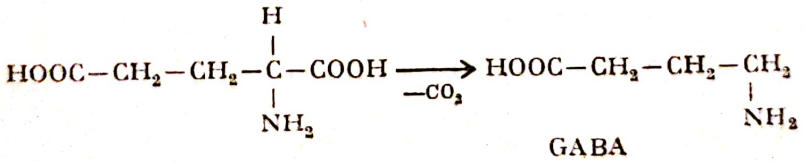
S-a menţionat că, în afara celor 22 de aminoacizi care intră în structura proteinelor, în natură se întîlneşte un mare număr de aminoacizi, dintre care unii au o deosebită importanţă biologică, cum ar fi :

β-alanina (*acid β-aminopropionic*), format în organism prin decarboxilarea enzimatică a acidului aspartic. Aminoacid de mare importanţă, intrînd în structura mai multor componente biologice indispensabile ca de pildă acidul pantotenic, o vitamină hidrosolubilă şi care, la rîndul ei, constituie o componentă a coenzimei A. Se mai întîlneşte în structura unor dipeptide localizate în muşchi, şi anume carnozina şi anserina



acid aspartic β-alanină

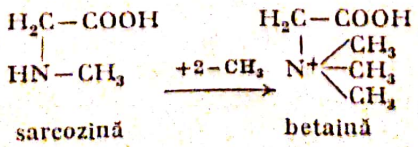
Acidul γ-aminobutiric se formează în organism prin decarboxilarea acidului glutamic. GABA are un mare rol în transmiterea impulsurilor nervoase, fiind un component tipic al ţesutului cerebral al mamiferelor.



GABA

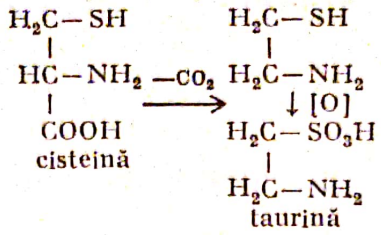
Sarcozina este derivatul N-metilic al glicocolului şi are o acţiune antitumorală prin blocarea biosintezei bazelor purinice, unităţi structurale ale acizilor nucleici. Face parte din grupa antimetaboliţilor, substanţe mult utilizate astăzi în combaterea unor grave maladii, printre care şi cancerul.

Betaina, derivatul trimetilat al glicocolului, are un mare rol lipolitic, împiedicînd depunerile excesive de lipide în diverse organe, mai ales în ficat :

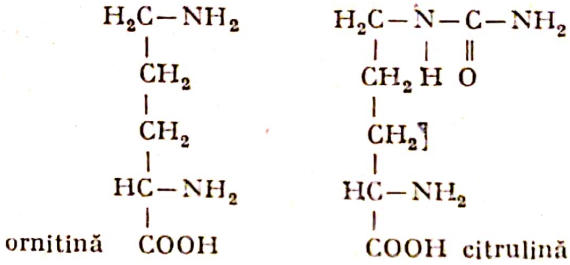


sarcozină betaină

Taurina este un acid aminosulfonic, care ia naştere prin decarboxilarea şi oxidarea cisteinei şi care, alături de glicocol, esterifică acizii biliari.

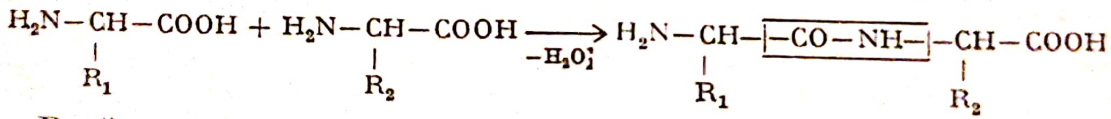


Ornitina şi *citrulina* sînt doi aminoacizi care participă în ciclul de formare a ureei, metabolit al organismului uman.



3.3. PEPTIDELE

Prin unirea a doi, maximum a 50 de aminoacizi, iau naştere *peptidele* sau *polipeptidele*. Legătura realizată în urma reacţiei între gruparea carboxilică a unei molecule de aminoacid şi gruparea amino a altei molecule de aminoacid se numeşte *legătură peptidică* (subliniată mai jos) :



Dacă se apreciază masa moleculară medie a unui aminoacid în jur de 120, rezultă că masa moleculară maximă a unui polipeptid este de aproximativ 6 000. Prin unirea a mai mult de 50 de aminoacizi se formează proteinele (dacă sinteza are loc în celule), a căror masă moleculară depinde în mod evident de numărul total al aminoacizilor constitutivi, putînd fi cuprinsă între 6 000 şi 1 000 000 (în cîteva cazuri izolate chiar mai mult). Denumirea de proteină derivă de la grecescul „protos", care înseamnă primul. Împărţirea făcută mai sus este totuşi arbitrară, necesară mai mult din punct de vedere didactic.

Peptidele formate din mai mult de patru molecule de aminoacizi, care au deci cel puţin trei legături peptidice, dau *reacţia biuretului*. Această reacţie, fiind specifică legăturii peptidice, va da informaţii precise asupra existenţei peptidelor sau proteinelor în lichidele biologice.

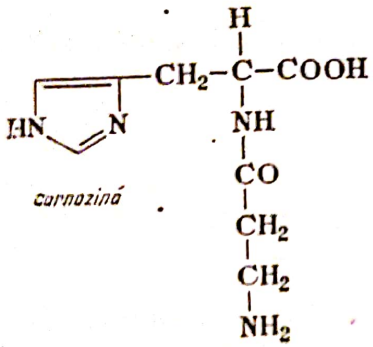
În ultimul timp peptidelor li se acordă o importanţă din ce în ce mai mare, datorită identificării unui număr foarte mare de asemenea compuşi care, deşi în cantităţi foarte mici, au valori metabolice remarcabile.

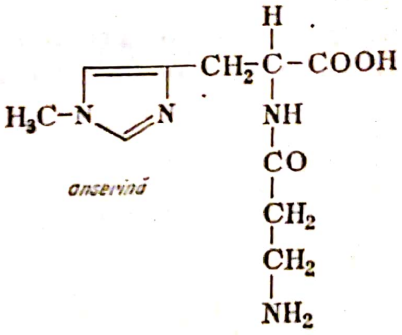
Scanned with OKEN Scanner

3.3.1. DIPEPTIDE

Principalele dipeptide naturale sînt *carnozina* şi *anserina*, cu structuri asemănătoare, fiind, amîndouă, componente specifice ale muşchilor, prima a muşchilor mamiferelor, iar anserina a muşchiului pectoral al păsărilor.

Atît carnozina cît şi anserina iau naştere prin unirea histidinei cu β-alanina, diferenţa constînd în faptul că anserina conţine o grupare metil în ciclul imidazolic. Denumirea chimică a acestor dipeptide este β-alanil-histidină, respectiv β-alanilmetilhistidină, deoarece pentru a se preciza modul în care are loc formarea legăturii peptidice aminoacidul care participă cu gruparea sa carboxilică primeşte sufixul *-il* (în cazul prezentat β-alanina).

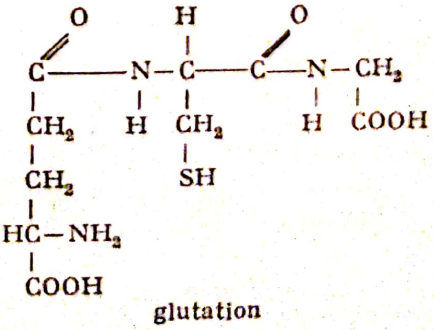




Cu toate eforturile depuse de cercetători, rolul biologic al acestor dipeptide nu s-a putut încă preciza. S-ar părea că au un rol de substanţe tampon, un posibil rol în contracţia musculară şi un rol, neconfirmat însă, de „rezervor" de grupări fosfat, identificîndu-se şi derivaţii fosforilaţi respectivi.

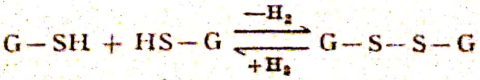
3.3.2. TRIPEPTIDE

Cel mai cunoscut tripeptid este *glutationul*, substanţă prezentă în toate celulele, fapt care atestă importanţa lui biologică. Glutationul ia naştere prin unirea acidului glutamic cu cisteina şi glicocolul (glicina). Deoarece acidul glutamic şi cisteina participă în legăturile peptidice cu grupările lor carboxilice, denumirea chimică va fi δ-glutamilcisteinil-glicină :



glutation

Prezenţa grupării tiolice libere, provenite de la cisteină, conferă glutationului o serie de proprietăţi biologice aparte, deosebit de importante. Hidrogenul grupării tiolice poate fi cedat unei substanţe acceptatoare de hidrogen, cu unirea a două molecule de glutation redus, formîndu-se o moleculă de glutation oxidat. Această reacţie poate fi redată schematic în modul următor :



glutation redus — glutation oxidat

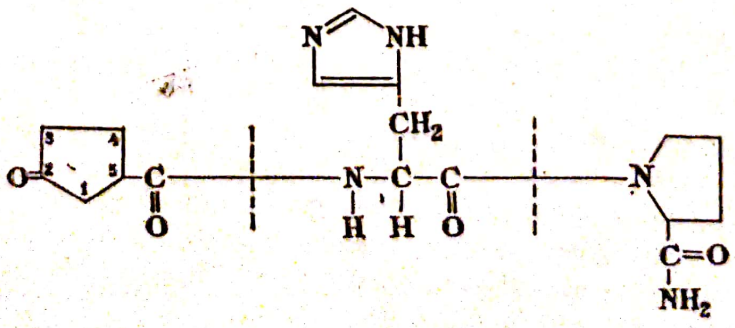
Transformarea din forma redusă în forma oxidată și invers este catalizată de o enzimă numită glutationreductază. Posibilitatea aceasta de interconversiune reprezintă de fapt mecanismul de acțiune al glutationului care, putînd ceda și accepta hidrogen, face parte din categoria transportorilor neenzimatici de hidrogen. De menționat că un alt reprezentant al acestei categorii este și acidul ascorbic.

Datorită structurii sale și mecanismului de acțiune descris, glutationul participă în procesele de oxidoreducere ale organismului. De asemenea, glutationul determină un efect de protecție ale grupărilor —SH ale unor enzime denumite SH—dependente și poate chiar să formeze complexe cu o serie de enzime ce nu pot acționa în lipsa acestuia. Prin protejarea sau formarea unor complexe cu enzimele, glutationul are un efect antiinfecțios și antitoxic.

Dintre numeroasele manifestări metabolice ale glutationului merită menționată acțiunea sa strîns corelată cu o serie de hormoni, cum ar fi insulina.

3.3.3. POLIPEPTIDE CU ACTIVITATE BIOLOGICĂ

În ultimii ani, datorită dezvoltării tehnicilor și metodelor de cercetare, a fost posibil să se identifice, să se separe și să se stabilească structura unor peptide cu masă moleculară mică, formate din cîțiva aminoacizi, și care au funcțiuni biologice foarte importante; de pildă, o serie de compuși sintetizați în hipotalamus și care pot determina eliberarea unor hormoni secretați de hipofiză. Este vorba de „factorii de eliberare" (*releasing factors*), care au fost obținuți de puțin timp în stare pură, putîndu-se astfel stabili structura cîtorva dintre ei, primul fiind factorul de eliberare a hormonului de stimulare a tiroidei. Pentru a înțelege dificultățile de care s-au lovit cercetătorii care au lucrat și lucrează în această direcție este suficient de menționat că acest factor a putut fi obținut într-o cantitate de 2 mg pornindu-se de la 750 000 fragmente de hipotalamus. Produsul purificat este activ într-o cantitate de 1 ng (10^{-9} g). Acest „factor de eliberare" conține în structura sa acid glutamic (ciclizat), histidină și amida prolinei, avînd denumirea chimică 2-pirolidon-5-carboxilhistidilprolilamidă:



Dintre numeroasele peptide cu activitate hormonală cunoscute se mai amintesc două (descrise mai pe larg în capitolul „Sisteme de autocontrol și reglare") și anume *oxitocina* (sau *ocitocina*) și *vasopresina*, hormoni

ai hipofizei posterioare. Aceştia au fost primii hormoni polipeptidici sintetizaţi în laborator, produşii rezultaţi avînd acţiuni biologice identice cu ai celor naturali. Sinteza, efectuată de o echipă de cercetători condusă de Du Vigneaud, i-a adus acestuia, în anul 1953, premiul Nobel pentru medicină. Cei doi hormoni sînt formaţi din cîte 8 aminoacizi.

Angiotensina I, care are 10 aminoacizi şi *angiotensina II*, care are 8 aminoacizi au o acţiune hipertensivă.

Un alt polipeptid, cu 9 aminoacizi, identificat în plasmă, şi anume *bradichinina*, participă la reglarea presiunii sangvine.

3.4. PROTEINELE

3.4.1. STRUCTURA PROTEINELOR FIBRILARE ŞI GLOBULARE

O consecinţă a legării aminoacizilor prin intermediul grupărilor carboxil şi amino din poziţia α este aceea că oricît ar fi de lung lanţul unei proteine, el este realizat prin repetarea fragmentului $-NH-\underset{\displaystyle R}{\underset{|}{CH}}-CO-$,

deci făcînd abstracţie de radicalii R proteinele se aseamănă cu alţi polimeri naturali în sensul identităţii unităţii de bază. Dacă se ţine seama de cei 22 de radicali corespunzători celor 22 de aminoacizi naturali, rezultă imediat diferenţa marcată între proteine şi ceilalţi polimeri. Ca urmare a „combinării" în multiple moduri a aminoacizilor apare o mare varietate de proteine, aspect prezentat anterior. Cele cca 5 000 000 de proteine cît se presupune că există în organismul uman nu se diferenţiază însă numai din acest punct de vedere, ci şi prin modul de organizare a lanţurilor lor polipeptidice. Organizarea spaţială este la rîndul ei dependentă în bună măsură de radicalii R, aceştia nefiind simpli radicali de hidrocarbură, ci conţinînd grupări carboxil, amino, hidroxil şi tio.

Din cele de mai sus rezultă că nu se poate vorbi decît la modul general de structura proteinelor, precizările trebuind făcute pentru fiecare proteină în parte. Numărul proteinelor a căror structură este bine cunoscută astăzi este abia de cîteva zeci. Pentru uşurinţă, structura lor este discutată în funcţie de nivelul de organizare : *structură primară*, *secundară*, *terţiară* şi *cuaternară*.

De menţionat că, pe baza cunoştinţelor existente în prezent referitor la proteinele cu structură cunoscută, se pot face unele generalizări care permit să se deducă mai uşor structurile acelor proteine despre care s-au obţinut puţine cunoştinţe.

3.4.1.1. *Structura primară* constă în structura chimică a proteinei respective, cu alte cuvinte numărul total al aminoacizilor din care este formată, natura acestora şi ordinea în care sînt înlănţuiţi. Structura primară mai este denumită şi *secvenţa* aminoacizilor.

Lanţurile polipeptidice au un număr variabil de aminoacizi, de cele mai multe ori între 100 şi 300, masa moleculară a majorităţii proteinelor fiind cuprinsă între 12 000 şi 36 000 ; se cunosc însă numeroase proteine cu mase moleculare mult mai mari.

Scanned with OKEN Scanner

Prima secvenţă a aminoacizilor dintr-o proteină a fost determinată, după numeroşi ani de muncă, în anul 1955, de către Sanger, care a precizat-o în cazul insulinei, proteină cu activitate hormonală şi formată din 51 de aminoacizi (vezi „Sisteme de autocontrol şi reglare"). După 10 ani, în 1966, insulina a fost şi prima proteină sintetizată în laborator, în mod simultan de către trei echipe de cercetători din China, S.U.A. şi R.F.G.

TABELUL 4

Compoziţia în aminoacizi a unor proteine globulare şi fibrilare (unităţi per moleculă)

Aminoacidul	Proteine globulare		Proteine fibrilare	
	albumină	pepsină	elastină	colagen
Ala	3	18	56	107
Val	45	21	118	29
Leu	58	28	56	28
Ileu	9	27	26	15
Pro	31	15	136	131
Phe	33	14	29	15
Try	1	6	0	0
Met	6	5	0	5
Gly	15	38	376	363
Asp-NH_2	46	44	4	47
Glu	80	27	22	77
Lys	58	1	3	31
Arg	25	2	6	49
Ser	22	44	9	32
Thre	27	28	10	19
Cys	20	4	0	0
Tyr	18	18	8	5
His	16	1	0	5
Radicali nepolari %	55	50	93	72

Astăzi, în literatura de specialitate sînt anunţate din ce în ce mai multe secvenţe proteice complet elucidate. Tabelul 4 conţine numărul moleculelor de aminoacizi din cîteva proteine.

3.4.1.2. *Structura secundară*, cel de-al doilea nivel de organizare structurală a proteinelor, se referă la conformaţia spaţială a lanţului polipeptidic. Dacă în ceea ce priveşte structura primară proteinele globulare

Scanned with OKEN Scanner

nu prezintă diferenţieri faţă de cele fibrilare, în cazul structurii secundare acestea prezintă diferenţe notabile.

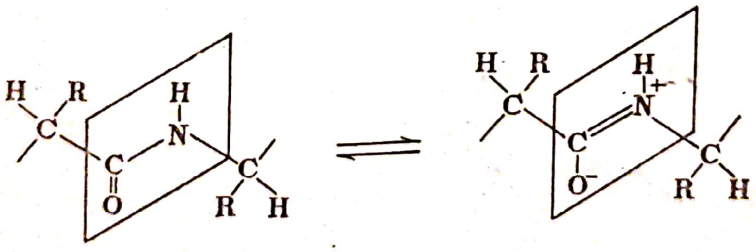
3.4.1.2.1. *Structura secundară a proteinelor fibrilare.* În jurul anilor 1930 Astbury a utilizat pentru prima oară tehnica difracţiei cu raze X la studiul structurii proteinelor, analizîndu-le pe cele fibrilare, în special keratina extrasă din păr, deoarece aceste proteine se pot obţine şi purifica mult mai uşor decît majoritatea celorlalte. De asemenea, ele sînt mult mai rezistente la temperatura camerei şi la diversele manipulări necesare pentru determinările respective.

Cu ajutorul metodei difracţiei cu raze X s-a putut aprecia iniţial poziţia în spaţiu a atomilor dintr-un cristal sau moleculă anorganică. Atomii, care în cristal se repetă la intervale fixe, pot fi puşi în evidenţă prin difracţia razelor X de către electronii care îi înconjură. Atomii cu densităţi electronice mari vor difracta razele X mai mult sau chiar le vor opri, în timp ce atomii cu densităţi mici de electroni (de exemplu atomii de hidrogen) vor devia doar puţin, sau deloc, razele X. Analiza matematică a imaginilor care se obţin permite deducţii exacte privind structura substanţei respective.

Cu ajutorul difracţiei cu raze X, aplicată de astă dată la substanţe organice, Astbury a constatat o anumită regularitate structurală a proteinelor fibrilare, ca şi faptul că nu sînt formate din lanţuri polipeptidice perfect liniare.

Începînd din anul 1939, Pauling şi Corey au preluat cercetările lui Astbury şi, după mulţi ani de cercetări, au putut aduce unele precizări asupra structurii secundare şi terţiare a proteinelor fibrilare.

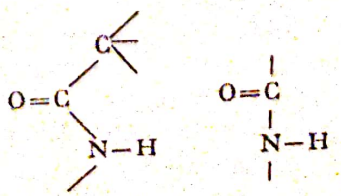
O observaţie de bază făcută în cazul proteinelor este că atomii de carbon şi de azot din legătura peptidică sînt mai apropiaţi decît în alte substanţe organice şi că această legătură nu este flexibilă ca legătura simplă, ci rigidă ca legătura dublă, aşa încît atomii nu se pot roti liber, deoarece legătura C—N se găseşte într-un echilibru tautomeric :



De rigiditatea legăturii peptidice se leagă şi o altă observaţie făcută de Pauling şi Corey, şi anume că ea este situată în acelaşi plan; planul legăturii peptidice următoare este rotit cu un număr de grade.

Trebuie notat şi faptul că oxigenul care provine din gruparea carboxilică este situat în *trans* faţă de hidrogenul care provine din gruparea aminică :

Aceste observaţii au dus la concluzia că lanţurile polipeptidice sînt dispuse sub forma unei spirale, denumită α-helix, cu înşurubare spre dreapta (fig. 4).



Analizele efectuate prin metoda difracţiei cu raze X în condiţiile unei înalte rezoluţii (sub 5 Å)

au permis stabilirea unui număr însemnat de detalii ale α-helixului, ca de exemplu faptul că fiecare spiră este formată din 3,6 unităţi de aminoacid, un aminoacid ocupînd în lungul spirei 1,5 Å. Spirele formate au un ax de simetrie longitudinal, distanţa în lungul acestuia între două spire fiind de 5,4 Å.

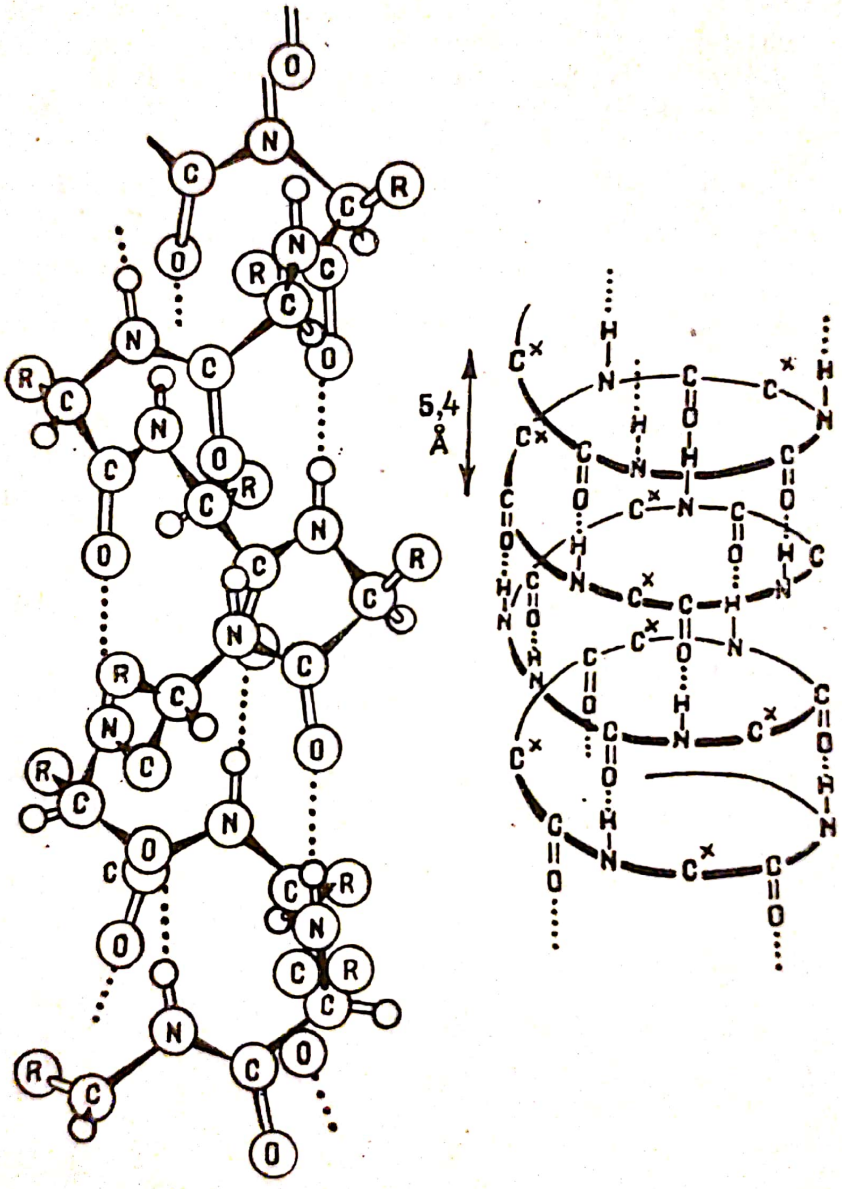


Fig. 4. Reprezentarea α-helixului.

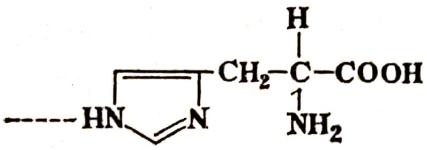
Realizarea unei spire din 3,6 unităţi de aminoacid determină plasarea întotdeauna a grupării $-\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}-$ de pe una din spire în dreptul grupării —NH— de pe spira următoare, între perechile de electroni neparticipanţi ai oxigenului şi hidrogenul de la —NH— formîndu-se legături de hidrogen care stabilizează α-helixul. Prin acţiunea temperaturii asupra proteinelor aflate în soluţie, cu pierderea structurii helicoidale, se confirmă existenţa acestor punţi.

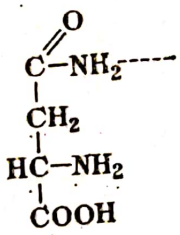
Radicalii R ai aminoacizilor se dispun în afara helixului. Între aceştia au loc de asemenea interacţiuni, ceea ce face ca structura helicoidală (secundară) să depindă de secvenţa aminoacizilor (structura primară). Acest lucru este mai evident în cazul proteinelor globulare a căror structură helicoidală nu este continuă, ci alternează cu zone liniare sau în aparenţă dezordonate.

În cazul structurii secundare a proteinelor, interacţiunile care se produc între diverşii radicali ai aminoacizilor pot conduce la formarea următoarelor tipuri de legături :

— *legătura peptidică de tip amidă*, formată prin unirea grupării carboxilice a unui aminoacid cu cea aminică a celuilalt aminoacid ;

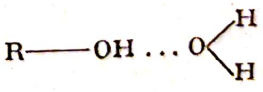
— *punţi de hidrogen*, realizate între grupări chimice din radicali, deci în afara spiralelor propriu-zise. Printre aminoacizii care pot forma punţi de hidrogen se numără histidina, glutamina, asparagina etc. ;

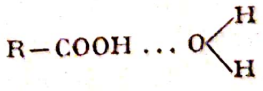


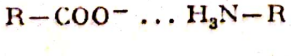


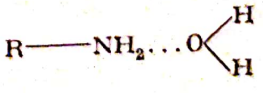
— *forţe de interacţiune hidrofilă*, care se stabilesc între radicalii care tind să formeze punţi de hidrogen şi apă ; de subliniat că practic toate structurile compuşilor biologici se realizează şi cu participarea apei şi că reacţiile biochimice au loc într-un mediu apos. Biomoleculele sînt deci într-o strînsă interrelaţie cu apa, fără de care nu poate exista dealtfel viaţa. Aminoacizii care participă în acest tip de legătură sînt cei care conţin grupări hidroxilice (serina, treonina, tirozina), grupări carboxilice libere (acizii aspartic şi glutamic) sau grupări amino libere (lizina) :

— *legături ionice*, care se stabilesc între grupările ionizate, respectiv între grupările $-COO^-$ ale acizilor aspartic şi glutamic şi grupările $-\overset{+}{N}H_3$ ale lizinei :









Structura β-keratinelor (structura în foaie pliantă). Atunci cînd α-keratina este încălzită într-un mediu umed şi e supusă, concomitent, unei tracţiuni, se modifică structura α-helicoidală datorită faptului că distanţele dintre spire devin mai mari prin desfacerea punţilor de hidrogen. Se formează o conformaţie în zigzag sau, după cum este denumită în mod curent, în foaie pliantă.

Proteine de tip β-keratinic s-au identificat şi în structura unor membrane celulare.

Scanned with OKEN Scanner

3.4.1.2.2. *Structura secundară a proteinelor globulare.* Aceasta nu este după cum s-a mai spus, identică cu aceea a proteinelor fibrilare. Datorită raportului şi a naturii diferite a aminoacizilor care intră în componenţa

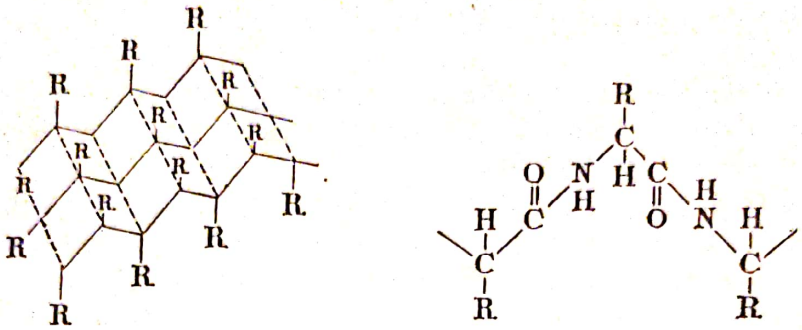


Fig. 5. Structura „în foaie pliantă" a β-keratinelor.

lanţurilor polipeptidice, structura helicoidală nu apare în mod necesar; există proteine globulare care nu au deloc structură α-helicoidală, altele o au în zone cu întinderi diferite, alternate cu zone liniare.

Proteinele globulare care au zone cu structură tip α-helix sînt stabilizate de aceleaşi legături şi forţe descrise anterior şi anume legătura peptidică, punţile de hidrogen, forţele de interacţiune hidrofile şi legăturile ionice.

Axa de simetrie longitudinală pe care o au proteinele fibrilare lipseşte la cele globulare.

3.4.1.3. *Structura terţiară* reprezintă un grad de organizare superior, prin care se înţelege modul în care se află dispusă în spaţiu întreaga moleculă proteică, întrucît nici structura primară şi nici cea secundară nu pot explica în totalitatea lor proprietăţile fizico-chimice şi biologice ale proteinelor fibrilare sau globulare. Conformaţia proteinelor poate fi ordonată (α-helicoidală sau nu), ca în cazul proteinelor fibrilare (keratinele, colagenul, elastina) pe întreaga dimensiune a moleculei, fapt care le va conferi un grad de rezistenţă mecanică deosebit de mare sau va prezenta zone ordonate (α-helicoidale), alternînd cu zone în care lanţurile polipeptidice sînt încolăcite, în aparenţă dezordonat.

În cele două tipuri de proteine, deşi unităţile structurale sînt aceleaşi, adică cei 22 de aminoacizi (tab. 3), secvenţa lor este net diferită. În cazul proteinelor fibrilare, structura terţiară se referă şi la asociaţiile moleculare care iau naştere prin unirea a două, trei sau a mai multor molecule identice, alcătuind un tot structural şi funcţional indisolubil legat. Precizarea aceasta este absolut necesară, deoarece proteinele globulare, spre deosebire de cele fibrilare, pot avea o a patra structură, *structura cuaternară.*

În afară de legătura peptidică, în structura terţiară se întîlneşte şi legătura disulfurică, care se formează între două molecule de cisteină din lanţul polipeptidic. Această legătură este caracteristică structurii terţiare şi se întîlneşte mai ales la proteinele globulare, deşi a fost identificată şi la unele proteine fibrilare; se mai numeşte şi punte disulfurică. După cum se va vedea, prin desfacerea acestor punţi, structura proteinelor (mai ales a celor globulare) se modifică ireversibil, ele modificîn-

du-şi proprietăţile fizico-chimice şi pierzîndu-şi însuşirile biologice specifice. Şi celelalte legături, menţionate la structura secundară, contribuie la consolidarea structurii terţiare.

3.4.1.3.1. *Structura terţiară a proteinelor fibrilare. Structura keratinelor*, proteine fibrilare care se găsesc în păr, unghii şi piele, se caracterizează printr-un mare grad de insolubilitate şi o rezistenţă mecanică deosebită, datorate structurii lor. Există mai multe tipuri de β-keratine. Marea lor majoritate sînt alcătuite din lanţuri lungi polipeptidice cu structură α-helicoidală, unite cîte trei, înfăşurîndu-se unul în jurul celuilalt, ceea ce conferă rezistenţa mecanică a acestor proteine. Lanţurile acestea, dispuse paralel şi formînd fibre lungi cu un singur ax, sînt unite între ele prin legături coordinative. Anumite tipuri de β-keratine longitudinale, identificate în piele, alcătuite tot din trei lanţuri polipeptidice α-helicoidale, conţin un număr mare de unităţi de cisteină şi de punţi disulfurice, fapt care conferă acestor proteine o structură deosebit de compactă, hidrofobă şi în acelaşi timp foarte flexibilă. Structura lor nu este complet precizată.

Colagenul este o proteină identificată în majoritatea ţesuturilor conjunctive ale vertebratelor şi care se mai găseşte, de asemenea, în tendoane, cartilaje şi în dermă, reprezentînd 30% din protidele unui mamifer. Colagenul este bogat în glicină, prolină, hidroxiprolină, iar, ca o componentă caracteristică, conţine 5-hidroxilizină. Molecula de colagen este multiplu spiralată. Cele mai simple unităţi structurale sînt nişte catene helicoidale cu perioada de identitate de 8, 6 Å şi cu 3 aminoacizi în fiecare spiră (prolină, hidroxiprolină, glicină). Aceste spirale se împletesc cîte trei, întocmai ca firele dintr-un odgon, legîndu-se între ele prin punţi de hidrogen. Sub această formă de *tropocolagen* este sintetizată proteina în celulele conjunctive (fig. 6).

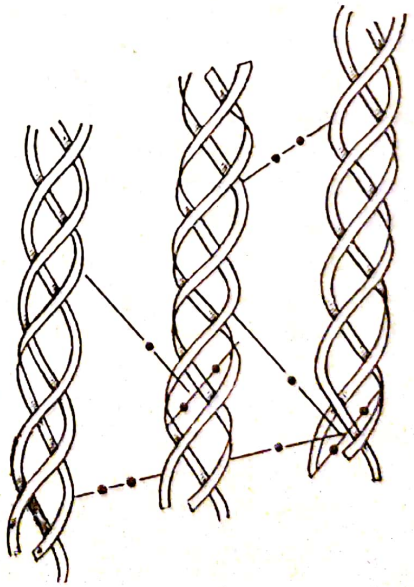


Fig. 6. Diagrama legăturilor încrucişate intermoleculare în colagen.

3.4.1.3.2. *Structura terţiară a proteinelor globulare*. Imensa varietate de proteine globulare avînd însuşiri biologice specifice se realizează nu numai prin plasarea în mod diferit a aminoacizilor în lanţurile polipeptidice (structura primară), ci şi prin plicaturarea (încolăcirea) în diverse moduri a lanţurilor cu structura primară şi secundară descrisă. Plicaturarea este posibilă deoarece în cazul proteinelor globulare zonele cu structură secundară α-helicoidală alternează cu zone în care lanţul polipeptidic este nestructurat. La aceste concluzii au ajuns pentru prima dată K e n d r e w şi P e r u t z care au studiat simultan structura mioglobinei şi hemoglobinei. Precizarea încolăcirii lanţului de mioglobină, aşa cum este arătat în figura 7, s-a făcut utilizîndu-se pentru difracţie mai întîi radiaţii X cu lungime de undă mai mare (6 Å), care, neputînd localiza fiecare atom în parte, pot urmări în schimb traseul lanţului, iar zonele nespiralate, la

Scanned with OKEN Scanner

nivelul cărora se produce plicaturarea s-au studiat și prin difracția cu raze X cu λ mai mică.

Referindu-ne nu numai la mioglobină și hemoglobină (asupra cărora se va reveni la descrierea cromoproteinelor), ci în general la proteinele globulare, s-a remarcat prezența în zonele de plicaturare de regulă a aceloraşi aminoacizi care au primit denumirea de helix dezorganizatori — este cazul prolinei și hidroxiprolinei — sau a altora care destabilizează α-helixul cum sînt serina, izoleucina, treonina, acidul glutamic, aspartic etc. Dezorganizarea α-helixului în zonele în care apare prolina sau hidroxiprolina se explică prin faptul că acești aminoacizi, avînd gruparea amino mascată, nu pot participa la formarea legăturilor de hidrogen; efectul destabilizator al celorlalți aminoacizi ține de natura radicalilor acestora.

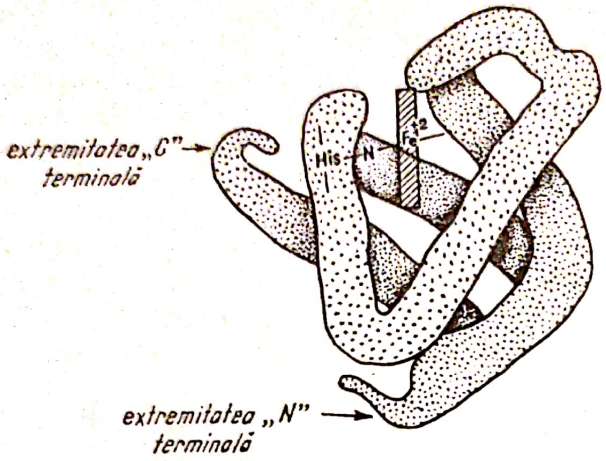


Fig. 7. Molecula de mioglobină. Incolăcirea reprezintă structura terțiară, cu implantarea ionului Fe^{2+} în centrul său.

Din punct de vedere fizico-chimic, plicaturarea poate fi explicată și ca o tendință de ascundere a unor zone hidrofobe ale lanțului polipeptidic în interior și, dimpotrivă, de plasare în exterior a zonelor hidrofile care determină solubilitatea.

Din punct de vedere energetic, lipsa pe anumite zone a legăturilor de hidrogen caracteristice α-helixului, determină o creștere a instabilității. Aceasta este compensată în schimb de numeroase alte legături care se realizează prin grupările chimice ale radicalilor din diferite puncte ale lanțului și care se întîlnesc în spațiu.

În cazul enzimelor, structura terțiară asigură plasarea în anumite puncte pe suprafață a grupărilor chimice responsabile de fixarea substratului și transformarea lui (centri activi).

3.4.1.4. *Structura cuaternară* constă în agregarea a două sau mai multe molecule proteice, identice sau ușor diferite structural. Prin simpla diluare a soluției sale sau prin ușoară acidulare, hemoglobina, avînd masa moleculară de 65 000, disociază în două subunități, fiecare cu masa moleculară pe jumătate. La rîndul lor cele două subunități pot fi disociate în anumite condiții eliberînd, fiecare, cîte o globină α și una β (vezi „cromoproteine"). Glutamicodehidrogenaza, gliceraldehidfosfatdehidrogenaza și multe alte enzime sînt de asemenea formate din mai multe molecule identice (*protomeri*), unite prin legături labile în agregate mari numite *oligomeri*. În glutamicodehidrogenază numărul protomerilor este de 8; există și proteine oligomeri cu număr mai mare de protomeri.

Legăturile care se realizează între protomeri sînt slabe, dovadă ușurința cu care ele pot fi rupte. Cînd oligomerii au mai mult de doi protomeri, disocierea poate avea loc în trepte, așa cum s-a arătat în cazul

Scanned with OKEN Scanner

hemoglobinei. Compușii intermediari între oligomeri și protomeri, avînd în general funcții reglatoare în cadrul metabolismului, poartă numele de *subunități*.

Asamblarea protomerilor în subunități și în continuare a acestora în oligomer, se realizează strict specific, astfel încît dacă se realizează condițiile de disociere pînă la protomeri și apoi de reasociere a acestora, se obține oligomerul cu exact aceleași însușiri ca cel inițial. La această asamblare

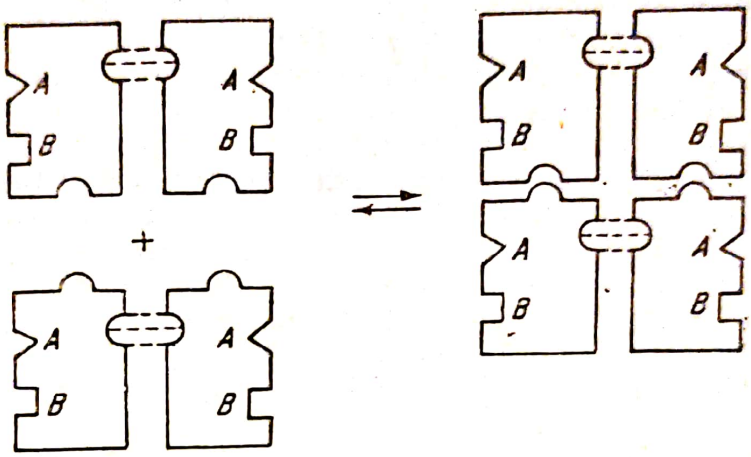


Fig. 8. Structura cuaternară a hemoglobinei. A, B-locusuri specifice (catalitice și alosterice) ale proteinelor ; ..... legături coordinative.

specifică își aduc contribuția elemente caracteristice ale structurii terțiare ; asamblarea corespunde totodată necesităților termodinamice de realizare a unor sisteme mai stabile. În ultimul timp devine tot mai clar și faptul că și din punctul de vedere al biosintezei proteinelor în sine și a excluderii posibilității erorilor în cursul biosintezei, este avantajos să se obțină proteine cu mase moleculare relative mai mici, care să fie asamblate în structuri complexe.

În figura 8 se redă intuitiv legarea protomerilor în cele două subunități și apoi a acestora în oligomer, în cazul hemoglobinei. Asupra mecanismelor de reglaj prin subunități-oligomer se va reveni la hemoglobină și enzime alosterice.

3.4.2. PROPRIETĂȚI FIZICO-CHIMICE ALE PROTEINELOR

Proprietățile fizice și chimice ale proteinelor sînt în legătură directă cu masa moleculară mare, cu numărul ridicat al grupărilor ionizate și cu fragilitatea lanțurilor polipeptidice.

Privitor la solubilitatea proteinelor s-au făcut cîteva referiri la începutul acestui capitol. Soluțiile proteinelor diferă însă de soluțiile compușilor cu moleculă mică ; datorită dimensiunilor mari ale proteinelor, soluțiile acestora se comportă în multe privințe asemănător coloizilor. Astfel, ele difuzează lumina (efect T y n d a l l), sedimentează prin ultracentrifugare (dacă se realizează cîmpuri de 100 000—4 000 000 mai mari decît gravitația terestră) au viscozități și presiuni osmotice ridicate. Fiecare din însușirile enumerate stă la baza uneia sau chiar mai multor tehnici care permit stabilirea masei moleculare, a formei și dimensiunilor macromoleculelor, a afectării structurii în cursul extracției și purificării etc.

Scanned with OKEN Scanner

Grupările ionizate, în special grupările carboxil și amino din radicalii atașați lanțurilor polipeptidice, conferă proteinelor echilibre protonice cu totul asemănătoare celor discutate pe larg în cazul aminoacizilor. Migrarea în cîmp electric a proteinelor și caracterul lor de amfoliți prezintă importanță practică și teoretică cu totul deosebită. Astfel, electroforeza constituie, alături de cromatografie, metoda cea mai eficientă de separare și purificare a proteinelor; în clinică electroforeza proteinelor plasmatice constituie o determinare curentă (vezi „Proteine plasmatice"). Menținerea în limite extrem de restrînse a *p*H-ului sîngelui (7,33—7,42), ca și a altor lichide biologice se realizează în primul rînd prin participarea proteinelor (vezi și „Hemoglobina").

Fragilitatea deosebită a proteinelor este în directă legătură cu structura lor complexă. Termenul „denaturare" este utilizat în legătură cu efectele produse de numeroși factori fizici (temperatură, radiații, agitări mecanice etc.) și reactivi (acizi, baze, alcooli, uree etc.) asupra structurii proteinelor, cu consecințe directe asupra funcției biologice. Se produc modificări la nivelul structurii terțiare, evident însă și ale structurilor cuaternară și secundară, în mai mică măsură cea primară. După intensitatea de acțiune a agenților enumerați și timpul cît proteina a fost supusă acestor acțiuni, denaturările pot fi reversibile și ireversibile. O ilustrare sugestivă a denaturării reversibile și ireversibile este prezentată în figura 9.

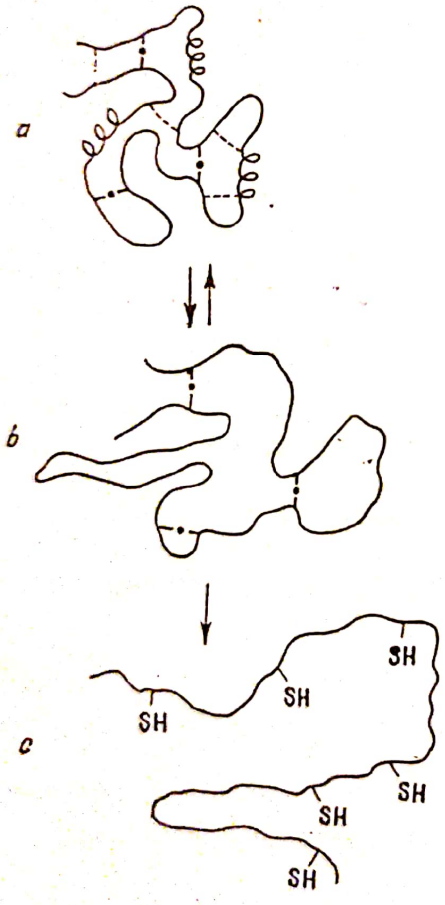


Fig. 9. Denaturarea unei proteine globulare: a) proteină nativă; b) proteină denaturată reversibil; c) proteină denaturată ireversibil; ..... legături de hidrogen.

De cele mai multe ori denaturările ireversibile se traduc prin precipitarea proteinelor din soluții. Acidul tricloracetic, sărurile unor metale grele, alcoolul, acetona, ureea, care produc asemenea efecte, sînt curent utilizați în calitate de agenți de deproteinizare. Există însă și situații cînd prin precipitare proteinele nu se denaturează; este cazul precipitărilor cu soluții saline la pH_i și cu unii solvenți organici.

Date acumulate în ultimul timp atestă că multe din denaturările considerate pînă nu cu mult în urmă ireversibile pot fi total sau în mare măsură reversibile; aceasta se poate însă realiza numai prin aducerea proteinei denaturate în condiții standard (apropiate de cele *in vivo*) și menținerea în aceste condiții un timp mai îndelungat. Refacerea structurii (și deci redobîndirea însușirilor biologice), dovadă grăitoare a uneia din însușirile fundamentale a sistemelor din lumea vie — autoorganizarea — se realizează în concordanță deplină cu legile fizice, chimice și termodinamice.

Scanned with OKEN Scanner

Alte proprietăţi ale proteinelor, în special proprietăţi chimice (hidrolize, reacţii de culoare etc.) constituie obiect pentru manualele de lucrări practice.

3.4.3. PROTEINE PLASMATICE

Componenta lichidă care se separă prin centrifugarea sîngelui înainte ca aceasta să fi avut timp să coaguleze (sau dacă s-a împiedicat coagularea prin adaos de anticoagulanţi ca heparină, citrat de sodiu, oxalat de potasiu etc.) se numeşte plasmă. Cantitativ, plasma constituie 55% din compoziţia sîngelui, restul de 45% fiind reprezentat de elementele figurate (eritrocite, leucocite, trombocite).

Prin intermediul sîngelui se stabileşte legătura între diferitele organe şi ţesuturi, fiind un veritabil cărăuş pentru un număr însemnat de metaboliţi de natură organică şi anorganică, inclusiv enzime şi hormoni.

Cu toate că pătrunderea şi eliminarea acestor compuşi se face în mod continuu, datorită proceselor de reglaj extrem de eficiente, concentraţia diferiţilor constituenţi ai plasmei variază în mod normal în limite foarte restrînse.

Proteinele constituie din punct de vedere cantitativ componenta majoră dizolvată în plasmă, respectiv 6,3 — 8,2 g proteine la 100 ml plasmă. Există o gamă foarte largă de proteine plasmatice, cercetări recente evidenţiind peste o sută de fracţiuni diferite. Dintre acestea unele sînt holoproteine, altele sînt heteroproteine, diferenţiindu-se de asemenea prin masa moleculară şi prin conformaţie.

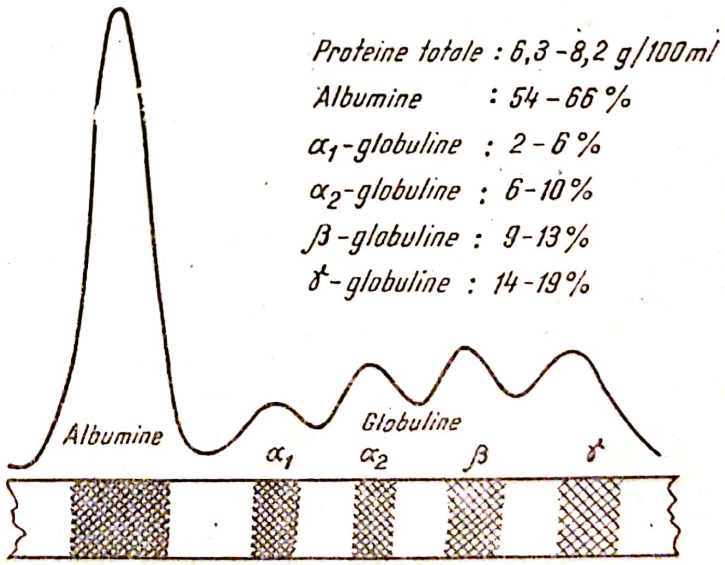


Fig. 10. Separarea electroforetică pe hîrtie a proteinelor plasmatice şi valorile normale ale acestora (%).

Procedeele utilizate pentru separarea în cîteva fracţiuni (fiecare conţinînd mai multe subfracţiuni) a proteinelor plasmatice sînt : precipitarea selectivă (de exemplu, cu soluţii de diferite concentraţii de sulfat de amoniu se pot separa trei fracţiuni : *fibrinogen*, *albumine* şi *globuline*) şi electroforeza, ultima permiţînd obţinerea a şase fracţiuni respectiv *albumine*, α_1-, α_2-, β_1- şi γ-*globuline*, precum şi *fibrinogen* (fig. 10). Subfracţionarea acestora se poate realiza în continuare prin procedee de imunoelectroforeză.

Separarea electroforetică a proteinelor plasmatice este curent utilizată în clinică, variaţia faţă de valorile normale a fracţiunilor de mai sus consti-

tuind indicii extrem de prețioase în stabilirea unor diagnosticuri sau în urmărirea evoluției bolii. Din punct de vedere biochimic variațiile în afara limitelor normale apar în situații în care sînt alterate fie procesele de biosinteză, fie de degradare a acestor proteine ca urmare a afectării organelor la nivelul cărora au loc aceste procese precum și în numeroase alte situații. Tabelul 5 redă în rezumat un număr de 14 proteine plasmatice (șase separate electroforetic, celelalte prin procedee mai complicate), cu o serie de caracteristici ale lor, inclusiv cu situațiile în care se produc variații în afara limitelor normale.

3.5. HETEROPROTEINELE

3.5.1. CROMOPROTEINELE

Cromoproteinele fac parte din marea clasă a heteroproteinelor, fiind formate dintr-o componentă proteică (holoproteină) care este specifică fiecărui compus și dintr-o componentă neproteică (grup prostetic), care, absorbind anumite radiații din domeniul vizibil al spectrului, face ca întreaga moleculă să fie colorată (khroma = culoare). Grupul prostetic este comun mai multor compuși ai clasei.

Importanța biochimică în general și în mod particular pentru organismul uman a unor compuși din această clasă, este deosebită. De exemplu, gruparea prostetică de tip tetrapirolic este întîlnită în structura hemoglobinelor, a citocromilor, catalazelor și peroxidazelor, precum și în structura vitaminei B_{12}.

Clasificarea cromoproteinelor în funcție de criteriile menționate, specificîndu-se și principalii reprezentanți din fiecare categorie este următoarea :

Cromoproteine porfirinice
— *cu rol respirator* : hemoglobine ;
citocromi ;
enzime heminice : catalază, peroxidază etc.
cruorine (la nevertebrate).
— *fără rol respirator* : cloroplastine (plante) ;
ficocianine (alge) ;
ficoeritrine (alge).
Cromoproteine neporfirinice
— *cu rol respirator* : hemeritrine (nevertebrate) ;
hemocianine (moluște).
— *fără rol respirator* : carotenoide (crustacee) ;
purpură retiniană ;
feritină ;
siderofilină ;
hemocupreină ;
ceruloplasmină ;
zinc-proteine.

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL 5

Principalele caracteristici ale unor proteine plasmatice

Nr. crt.	Proteina	Masa moleculară	mg/100 ml	Funcţia biologică	Variaţii patologice
1	Prealbumină	50.000	10—40	Fixare şi transport de retinol şi tiroxină	Scade în afecţiuni hepatice grave
2	Albumină	65.000	3000—5000	Rol osmotic; rezervă de proteine, transport acizi graşi	Scade în ciroză, nefroze etc.
3	α_1-glicoproteină (seromucoid)	44.100	50—100	Genotipuri	Fluctuaţii în boli inflamatorii cronice: reumatism etc.
4	α_1-lipoproteină (LP-A)	180.000—350.000	300—700	Transport de lipide şi hormoni	Scade în afecţiuni hepatice
5	Ceruloplasmină	132.000	15—60	Enzimă (fixează Cu-redox)	Indicator în neoplasm
6	Haptoglobină	100.000	100	Se combină cu hemoglobina	Scade în afecţiuni hepatice, anemie hemolitică etc.
7	α_2-glicoproteine	350.000	150	Fixare şi transport de hormoni	Scade în afecţiuni inflamatorii
8	β-lipoproteine (LP-β)	2.400.000	220—700	Transport de lipide, colesterol şi hormoni	Fluctuaţii în patologia cardio-vasculară, nefroze
9	Siderofilină (transferină)	80.000	200—400	Fixare şi transport de fier	Boli inflamatorii, neoplasm, nefroză etc.
10	Fibrinogen	340.000	200—400	Coagularea sîngelui	Scade în alterarea funcţiei hepatice
11	Proteină-C-reactivă	140.000	1	Favorizează fagocitoza	Boli inflamatorii: reumatism etc.
12	γ-globuline IgG; IgA; IgM; IgD; IgE	150.000—900.000	800—1 800	Anticorpi, genotip, sisteme de grup	Boli infecţioase, ereditare, sindroame metabolice
13	Properdină	184.000		Activarea complementului	Infecţii
14	Lizozim	15.000	0,2	Bacterioliză	Leucemie

Scanned with OKEN Scanner

3.5.1.1. *Hemoglobina* sau mai corect hemoglobinele (deoarece au fost identificate în serul uman trei hemoglobine diferite din punct de vedere cantitativ, structural și funcțional) constituie principalul reprezentant al cromoproteinelor în organismul uman. În afară de aceste hemoglobine, în unele cazuri se întîlnesc și hemoglobine de alt tip, care se pot transmite ereditar, dintre care unele determină anemii deosebit de grave.

Rolul biologic al hemoglobinelor, acela de a transporta oxigenul de la plămîni pînă la cele mai îndepărtate celule din organism, este îndeplinit

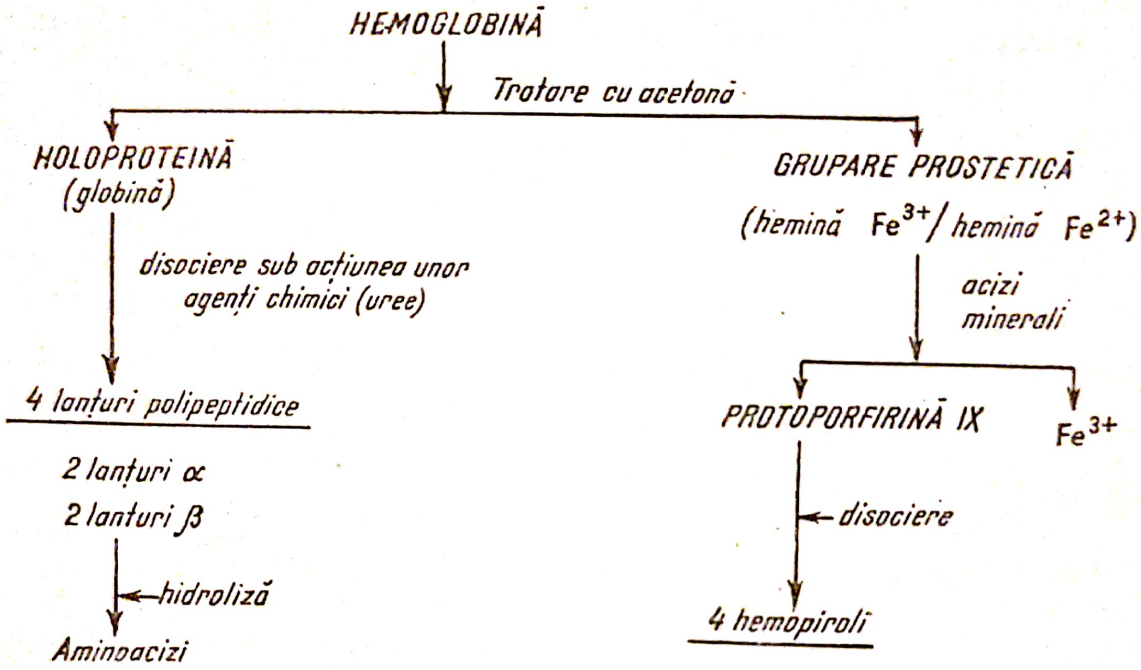


Fig. 11. Degradarea hemoglobinei pe cale chimică.

numai în condițiile integrității structurii. Hemoglobina este formată dintr-o componentă proteică, *globina*, și o grupare prostetică, numită *hem* sau *hemină*. Fiecare din cele două componente poate fi degradată la compuși mai simpli, așa cum reiese din figura 11 :

3.5.1.1.1. *Structura componentei proteice a hemoglobinei: globina.* Globina este o holoproteină cu structură globulară de unde i se trage și numele, cu o masă moleculară medie de 65 000, aceasta depinzînd de gradul de hidratare. Este formată din patru lanțuri polipeptidice, două cîte două identice, denumite lanțurile α și respectiv β ; în structura lanțurilor sînt întîlniți 20 de aminoacizi din cei 22 identificați în structura proteinelor. Fiind formată din patru monomeri, globina este deci un tetramer.

Diferențele structurale—și de aici derivă și diferențe de ordin funcțional—constau în mici variații ale structurii primare ale acestor două lanțuri α și β.

Structurile primare ale acestor două tipuri de lanțuri sînt astăzi perfect cunoscute datorită cercetărilor laborioase întreprinse de numeroși biochimiști între care : P e r u t z, K e n d r e w și I n g r a m. În afară de hemoglobinele fiziologic normale, astăzi se cunoaște și structura numeroaselor hemoglobine patologice. Una dintre metodele prin care a fost posibil să se obțină informații care să definească structura primară a acestor proteine, normale sau patologice, a fost aceea a amprentelor.

Scanned with OKEN Scanner

Structura lanţurilor α şi β ale hemoglobinei A_1. Hemoglobina A_1 este principalul reprezentant al hemoglobinelor existente în sîngele unui adult normal. Structura globinei acestei hemoglobine este următoarea: lanţurile α şi β diferă între ele atît ca număr de unităţi de aminoacizi, şi anume 141 în lanţul α şi 146 în lanţul β, cît şi în ceea ce priveşte ordinea în care sînt aranjaţi şi natura lor. Secvenţa acestor lanţuri, ca dealtfel a tuturor proteinelor din organismele animale, este riguros memorizată şi ulterior transmisă descendenţilor, orice modificare — chiar a unui singur aminoacid — determinînd grave tulburări metabolice. Aceste modificări sînt determinate de copierea greşită a informaţiei genetice cuprinsă în structura ADN sau de transmiterea ereditară a unei secvenţe anormale.

Ambele lanţuri, α şi β, derivă de la un precursor ancestral, întîlnit şi astăzi în muşchi, şi care se numeşte *mioglobină*. Mioglobina este formată numai dintr-un singur lanţ polipeptidic compus din 157 de aminoacizi (vezi „Structura terţiară a proteinelor").

Există o mare asemănare între structurile lanţurilor de tip α cu cele de tip β şi cu cea a mioglobinei; toate au cîte cinci zone în care aminoacizii formează lanţuri α-helicoidale, în general dispunerea celor trei lanţuri fiind aceeaşi.

Porţiunile liniare conţin aminoacizi cu grupări hidrofobe dispuse în afara lanţurilor, în interiorul acestora formîndu-se un lăcaş în care se cuibăreşte hemul, compus puternic hidrofob. Fiecare lanţ are, ca o contrabalansare, o zonă intens hidrofilă unde se va adiţiona labil apă.

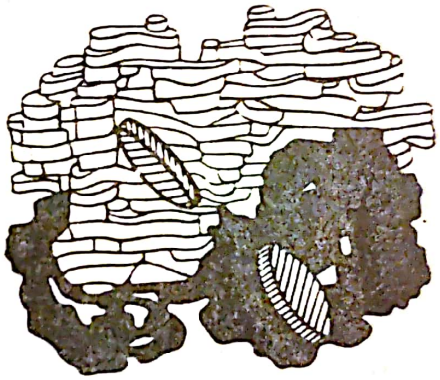


Fig. 12. Modelul spaţial al hemoglobinei; lanţurile α sînt albe, lanţurile β negre. Discurile reprezintă hemurile aşezate faţă în faţă (două nuclee sînt în spatele modelului).

Cele patru lanţuri ale globinei se unesc formînd o conformaţie specifică, unică, eliminîndu-se posibilitatea de legare a acestora în alt mod (fig. 12). Sînt excluse asociaţiile întîmplătoare, dezordonate, haotice. Cele patru lanţuri care se unesc într-un anumit mod sînt legate labil prin punţi de hidrogen sau forţe de interacţiune de tip Van der Waals, formîndu-se un ansamblu unic, bine conturat în spaţiu (vezi „Structura cuaternară a proteinelor").

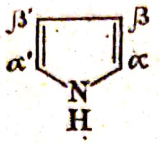
Ordonarea exactă în spaţiu a lanţurilor polipeptidice face ca hemoglobina să fie foarte solubilă, chiar şi în cazul în care conţine în structura ei patru molecule de hem, substanţă insolubilă în apă. Datorită solubilităţii ei, hemoglobina se poate concentra în eritrocit.

Lanţurile α şi β sînt sintetizate independent, în zone diferite, şi se unesc după ce în prealabil au înglobat în structura lor hemul, formînd hemoglobina. Aceasta explică de ce în hemoglobinele patologice sînt doar rareori modificate ambele lanţuri.

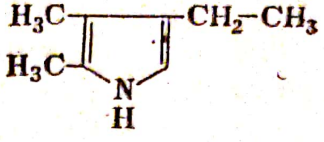
3.5.1.1.2. ***Structura grupării prostetice a hemoglobinei: hemul.*** Procesele chimice din schema de degradare a Hb, care nu au loc decît parţial în organism, permit înţelegerea mai uşoară a structurii grupării prostetice.

Scanned with OKEN Scanner

Hemopirolul are o structură ciclică, ce derivă de la pirol prin substituirea a trei atomi de hidrogen din pozițiile α′, β și β′.

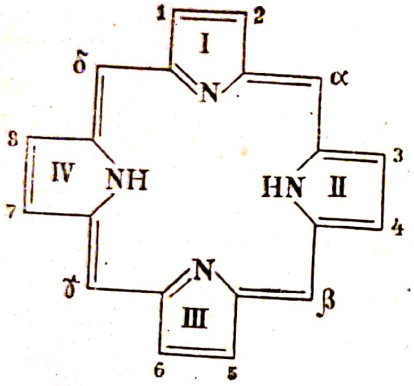


pirol



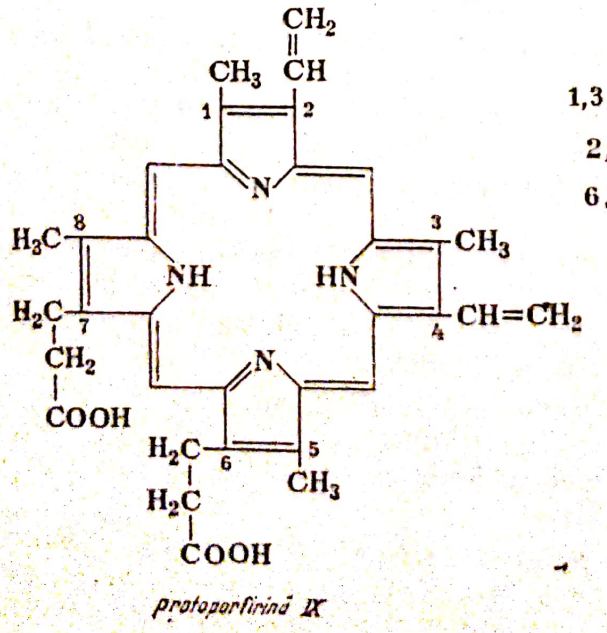
hemopirol

Porfirinele conțin în structura lor un ciclu tetrapirolic denumit porfină, în care se disting duble legături conjugate. Numărătoarea atomilor de carbon ai acestui ciclu se face luînd în considerare numai atomii de carbon β și β′ ai hemopirolului. Cele patru cicluri pirolice sînt unite prin patru punți metinice notate cu litere din alfabetul grecesc, începînd de la primul ciclu. Cei opt atomi de hidrogen pot fi înlocuiți cu diferiți radicali care, în cazul porfirinelor identificate în organismele animale, pot fi : metil ($-CH_3$), etil ($-CH_2-CH_3$), hidroxietil ($-CH_2-CH_2OH$), vinil ($-CH=CH_2$) sau propionil ($-CH_2-CH_2-COOH$). În organismul uman au fost identificate următoarele porfirine : *etio-*, *mezo-*, *deutero-*, *copro-*, *uro-*, *hemato-* și *protoporfirina*. Aceste porfirine, care diferă între ele prin natura radicalilor amintiți anterior, constituie fie etape intermediare ale biosintezei hemului, fie produși ai metabolismului său.



porfină

Protoporfirina, porfirină care intră în structura hemului, are trei radicali diferiți și anume : metil, vinil și propionil. Deși sînt posibili 15 izomeri diferiți ai protoporfirinei, cu toții sintetizați în laborator, în organismul animalelor superioare nu este întîlnit decît un singur izomer denumit protoporfirină IX care, în pozițiile **1**, **3**, **5** și **8** are radicali metil, în pozițiile **2** și **4** radicali vinil, iar în **6** și **7** radicali propionil :

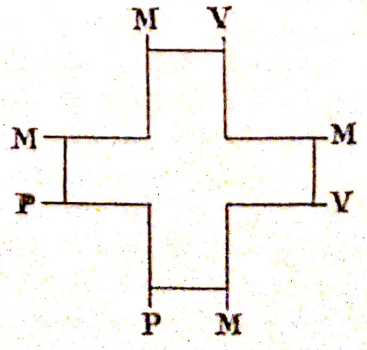


protoporfirină IX

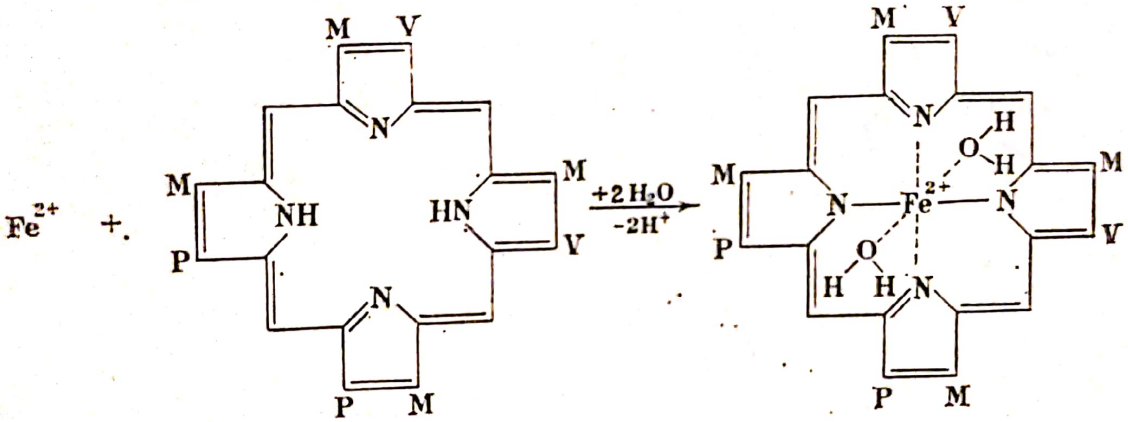
1,3,5,8 = —CH_3 (M)

2,4 = —$CH=CH_2$ (V)

6,7 = —CH_2-CH_2-COOH (P)

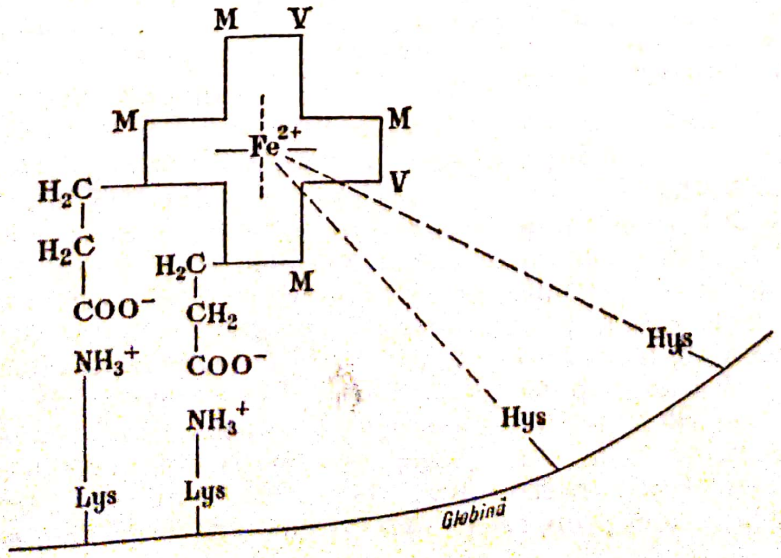


3.5.1.1.3. *Unirea protoporfirinei IX cu ionul feros* (Fe^{2+}) *şi cu globina.* Prin unirea ionului feros cu protoporfirina IX se formează un chelat metalic, de culoare roşie, numit hem, care este de fapt gruparea prostetică a hemoglobinelor. Fierul este strins legat de protoporfirină prin două legături covalente care se stabilesc între ionul metalic şi cei doi atomi de azot din ciclurile II şi IV. Ionul feros, care are şase legături coordinative, se mai leagă şi cu ceilalţi doi atomi de azot din ciclurile I şi III, iar ultimele două valenţe sînt satisfăcute prin formarea unor punţi de hidrogen cu două molecule de apă, constituind forma hidratată a hemului. Această formă hidratată nu este însă stabilă, fiind necesară legarea coordinativă a fierului de o bază azotată ca, de exemplu, amoniacul sau piridina în cazul hemoglobinei extrase şi purificate, sau de o unitate de histidină din structura globinei, prin formarea unei punţi de hidrogen, în cazul hemoglobinei din sînge.



Globina conţine un mare număr de unităţi de histidină, şi anume aproximativ 10% din totalul aminoacizilor care o compun.

Protoporfirina este, la rîndul ei, legată de globină prin legăturile ionice care se stabilesc între radicalii propionil din poziţiile **6** şi **7** şi gruparea amino a lizinei din structura globinei. Schematic, aceste legături pot fi reprezentate astfel :



Scanned with OKEN Scanner

Prin legarea coordinativă a celor patru lanțuri polipeptidice care definesc structura formei active a hemoglobinei se creează o conformație care, pe lîngă faptul că acceptă specific, cu multă ușurință, oxigenul de la nivelul plămînului, determină și o creștere a solubilității hemoglobinei. Conformația tetramerică este mult mai solubilă decît cea a monomerilor care o compun. Această conformație a fost redată în figurile 8 și 11. În figura 13 se pot urmări structurile primară, secundară și terțiară ale unui protomer.

3.5.1.1.4. *Hemoglobinele fiziologice.* În sîngele uman de adult s-au identificat trei hemoglobine, a căror prezență este constantă, și anume hemoglobinele A_1, A_2 și F. Inițialele A și F semnifică adult, respectiv fetal. Proporțiile în care se găsesc cele trei hemoglobine sînt net diferite, și anume într-un ml de sînge de adult se găsesc 0,15 g HbA_1, 0,04 g HbA_2 și numai 0,0007 g HbF.

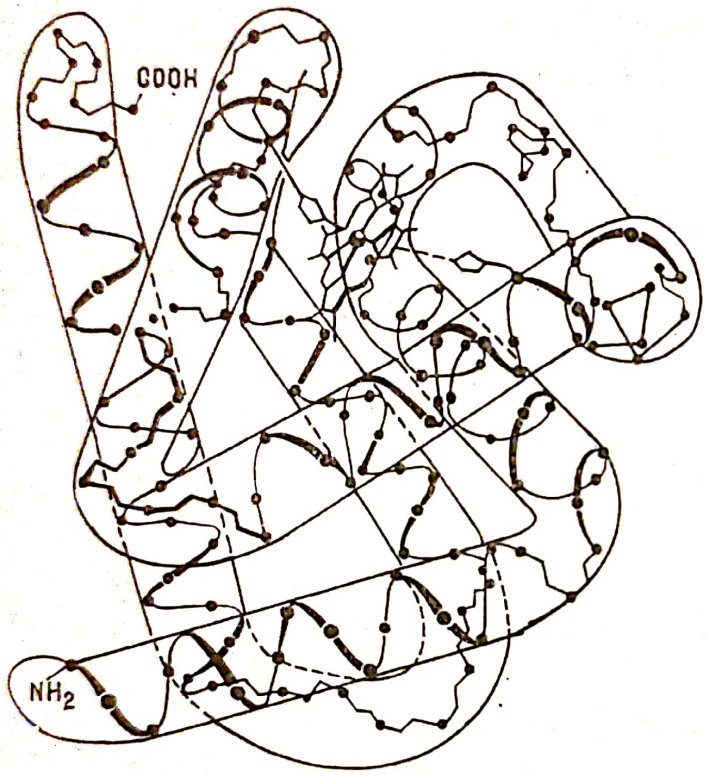


Fig. 13. Modelul structurii unuia din lanțurile hemoglobinei. Punctele reprezintă aminoacizii (structura primară), zonele spiralate – structura secundară, iar forma de ansamblu – structura terțiară.

Rolul fiziologic al hemoglobinei A_2 nu este precis definit. În ceea ce privește hemoglobina fetală, aceasta reprezintă un tip de hemoglobină adaptat inițial condițiilor de oxigenare din uter, și care continuă să mai fie sintetizată în cantitatea limitată menționată. Hemoglobina fetală reprezintă, între lunile a 3-a și a 8-a de viață intrauterină, aproximativ 80% din totalul hemoglobinelor din sîngele fătului. În primele săptămîni de viață se sintetizează un tip de hemoglobină denumită hemoglobină embrionară care, treptat, este înlocuită cu cea fetală și care, la rîndul ei, este înlocuită, după naștere, cu hemoglobina A_1, astfel că după doi ani de viață se ajunge la raportul menționat al celor trei hemoglobine.

Tipurile de hemoglobină menționate anterior, și anume HbA_1, HbA_2, HbF și Hb embrionară se diferențiază între ele prin faptul că au secvența lanțurilor β diferită, lanțurile α fiind însă identice. Deși aceste deosebiri structurale sînt relativ minore, consecințele fiziologice sînt enorme, fiecare din ele reprezentînd adaptări ale organismului față de diversele condiții de viață.

3.5.1.1.5. *Variante patologice de hemoglobine umane.* După cum se va vedea la descrierea acizilor nucleici și a biosintezei proteinelor, secvența aminoacizilor în lanțurile polipeptidice este codificată în ADN cromozomal. Înlocuirea uneia sau a mai multor baze azotate în structura ADN care codifică secvența unei proteine va determina o secvență mai mult sau mai

Scanned with OKEN Scanner

puţin schimbată a aminoacizilor. Consecinţa, în cazul de faţă, va fi sinteza unor globine cu o structură primară diferită de cea a globinelor din hemoglobinele normale. Mutaţiile acestea pot persista multe generaţii, altele se elimină însă, prin faptul că hemoglobinele sintetizate nu permit condiţii de oxigenare optime şi în consecinţă va surveni moartea, eliminîndu-se aşadar perpetuarea defectului de sinteză prin transmiterea sa urmaşilor.

Este necesară o precizare iniţială. Nu toate hemoglobinele anormale sînt şi patologice, cu alte cuvinte nu toate modificările care se pot produce au ca efect sinteze de hemoglobine ce nu pot să transporte oxigenul în condiţii optime sau să determine modificări în structura hematiei.

În ceea ce priveşte variantele de hemoglobine care nu determină consecinţe patologice, menţionăm că au fost puse în evidenţă o serie de variante transmise genetic descendenţilor, tipice anumitor populaţii care locuiesc din timpuri străvechi în aceleaşi ţinuturi şi care pot constitui chiar criterii de puritate rasială. Este cazul variantelor de hemoglobine tipice populaţiilor din Africa de vest, din jurul Mediteranei, din Asia de sud-est.

Categoria hemoglobinelor patologice nu este însă atît de dependentă de criteriile geografice şi rasiale, cu toate că şi în aceste cazuri se pot face o serie de corelări. La unele hemoglobine patologice este modificată secvenţa ambelor lanţuri, la altele numai secvenţa unui singur lanţ. De exemplu, în cazul hemoglobinei *S* (Hb*S*), în lanţurile de tip β locul acidului glutamic din poziţia **6** este luat de valină; prezenţa în sînge a acestui tip de Hb face ca hematiile să se deformeze căpătînd aspectul unei seceri ceea ce duce la o anemie gravă. Alte hemoglobine patologice sînt cele de tip *M*, al căror fier heminic se oxidează spontan la Fe^{3+} şi hemoglobinele Sydney, care au o capacitate redusă de a accepta oxigenul.

Prin modificarea structurii primare se modifică şi unele proprietăţi fizice ale hemoglobinelor, de exemplu solubilitatea şi încărcarea electrică.

TABELUL 6

Cîteva hemoglobine anormale

Nr. crt.	Denumirea Hb anormale	Lanţul în care este înlocuit aminoacidul	Poziţia în lanţ a aminoacidului	Aminoacidul din Hb normală	Aminoacidul din Hb anormală
1	*I*	α	**16**	Lys	Asp
2	G_H	α	**30**	Glu	Glu-NH_2
3	Norfolk	α	**57**	Gly	Asp
4	*M* Boston	α	**68**	Asp	Lys
5	*G* Philadelphia	α	**68**	Asp-NH_2	Lys
6	*O* Indonezia	α	**116**	Glu-NH_2	Lys
7	*C*	β	**6**	Glu	Lys
8	*S*	β	**6**	Glu	Val
9	*E*	β	**26**	Glu	Lys
10	Zürich	β	**63**	His	Arg

De aceea, electroforeza este metoda cea mai adecvată pentru punerea în evidenţă a diferitelor variante de hemoglobină. Evident, trebuie alese condiţii de *p*H care să permită modificarea sensului sau a vitezei de migrare.

În tabelul 6 sînt prezentate principalele hemoglobine identificate pînă acum, efectul pe care îl determină, lanţul în care s-a constatat modificarea secvenţei şi în ce constă aceasta.

Scanned with OKEN Scanner

Studiul teoretic al diverselor variante de hemoglobine a permis înţelegerea rolului fiecărui aminoacid din ambele lanţuri, precizîndu-se care dintre ei participă la legarea globinei de hem sau de fier, la legarea celor patru lanţuri polipeptidice, la legarea oxigenului etc.

3.5.1.1.6. *Combinarea hemoglobinei cu oxigenul.* Proprietatea hemoglobinei de a accepta oxigenul, dublată de posibilitatea de a-l transporta în organism, este uşurată de structura tetramerică ce permite atît acceptarea unei cantităţi mai mari de oxigen în plămîn, cît şi posibilitatea de eliberare a acestuia în mod treptat, în funcţie de presiunea de oxigen din ţesutul respectiv.

Legarea oxigenului de hemoglobină se face la nivelul celor patru atomi de fier conţinuţi în cele patru molecule de hem ale lanţurilor α şi β. Fierul din hemoglobină nu îşi schimbă valenţa în urma fixării oxigenului, el rămîne deci sub forma de ion feros. Pentru fixarea oxigenului una dintre legăturile coordinative dintre fier şi azotul ciclului imidazolic al histidinei din globină se desface, reformîndu-se cu oxigenul atmosferic. Ia astfel naştere *oxihemoglobina*, compus labil care, la o presiune scăzută de oxigen, deci la nivelul ţesuturilor, pune în libertate oxigenul cu reformarea hemoglobinei.

Legarea oxigenului de hemoglobină şi eliberarea sa constituie un model de adaptare biologică faţă de o anumită necesitate a organismelor superior organizate. Structura hemoglobinei este atît de precis armonizată cu scopul major pe care îl îndeplineşte, încît putem considera că este varianta biologică cea mai eficientă.

Analizîndu-se teoretic şi practic gradul de saturare a hemoglobinei în funcţie de presiunea oxigenului, s-a constatat nu un aspect hiperbolic al curbei, aşa cum ar fi trebuit să fie dacă ar fi fost vorba de o structură, să-i spunem normală, a hemoglobinei. Curba de saturare are un aspect sigmoid, care nu a putut fi înţeles şi explicat decît relativ tîrziu, după cunoaşterea structurii sale cuaternare. S-a considerat, iniţial teoretic şi ulterior s-a verificat practic, că cele patru subunităţi ale hemoglobinei nu fixează cu aceeaşi viteză oxigenul, existînd o influenţă din partea unor subunităţi asupra celorlalte.

Teoria unanim acceptată în prezent consideră ca unitate funcţională a Hb dimerul format dintr-un lanţ α şi unul β. Fixarea oxigenului de către un lanţ α conduce la o modificare discretă, conformaţională, iar aceasta, la rîndul ei, determină şi modificarea celuilalt lanţ al dimerului, lanţul β. Prin modificarea pe care o suferă lanţul β, acesta va accepta cu mai multă uşurinţă următoarea moleculă de oxigen. Odată dimerul unit cu cele două molecule de oxigen, va determina o modificare conformaţională şi a celorlalte două lanţuri din celălalt dimer, care va deveni mai apt pentru acceptarea a încă două molecule de oxigen, ceea ce va duce la saturarea hemoglobinei. Această acceptare a oxigenului precedată de labilizarea lanţurilor proteice este reflectată de aspectul sigmoid al curbei.

Schematizat, acest proces decurge după cum se arată în figura 14.

Se pot distinge cele trei trepte ce corespund gradului de oxigenare şi de modificare conformaţională a celor patru lanţuri polipeptidice. Pe acelaşi grafic este reprezentată şi curba de saturare cu oxigen a mioglobinei care se face proporţional cu concentraţia oxigenului din mediu, mioglobina neavînd mai multe subunităţi. De aceea, mioglobina va avea funcţii

Scanned with OKEN Scanner

diferite de ale hemoglobinei, nu va fi deci un cărăuş de oxigen, ci va constitui o sursă suplimentară de oxigen necesară proceselor oxidative care au loc în cursul contracţiei musculare.

Combinarea gradată şi controlată a hemoglobinei cu oxigenul, precum şi existenţa unor forme parţial saturate cu oxigen, permite oxigenarea tuturor celulelor, indiferent de presiunea de oxigen existentă la nivelul lor.

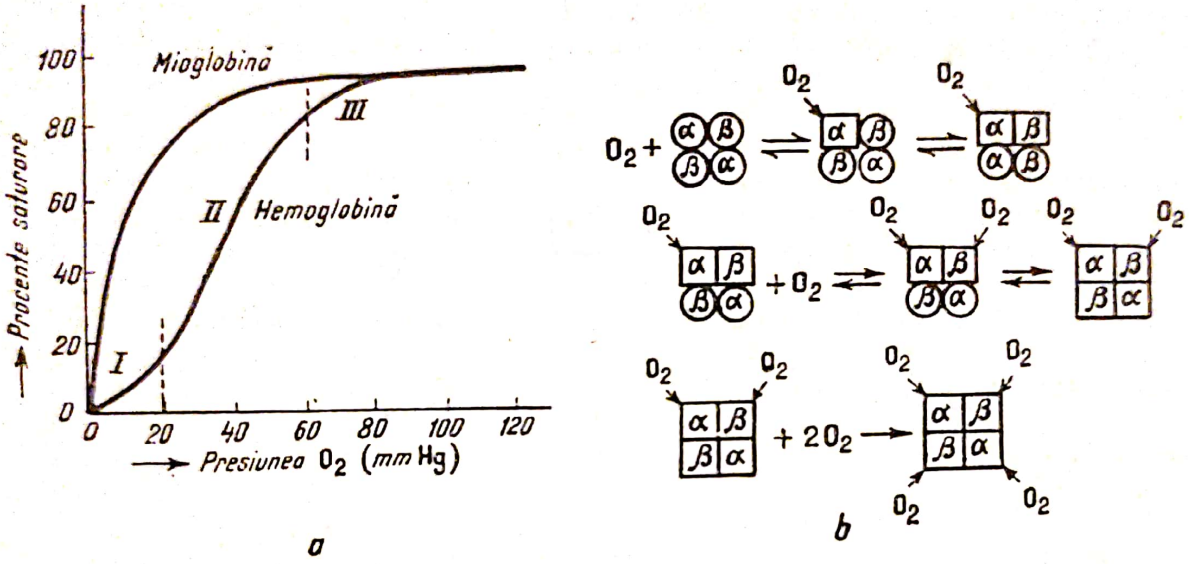


Fig. 14. Curbele de saturare cu oxigen a hemoglobinei şi mioglobinei (a) ; fixarea în etape a CO_2 de către hemoglobină şi modificările conformaţionale care se produc (b).

Comportarea specifică a hemoglobinei a constituit pentru M o n o d un model tipic de comportare a enzimelor cu rol de reglare, al *proteinelor alosterice.*

3.5.1.1.7. *Combinarea hemoglobinei cu alte gaze.* În afară de oxigen, hemoglobinele se mai pot uni reversibil şi cu alte gaze ; valenţa fierului în compuşii care rezultă este, ca şi în oxihemoglobină, Fe^{2+}.

Gazul pentru care hemoglobina are cea mai mare afinitate este oxidul de carbon ; cu acesta hemoglobina se combină de 200 de ori mai uşor decît cu oxigenul, formîndu-se *carboxihemoglobină,* mai stabilă decît oxihemoglobina. Acesta este motivul pentru care, într-un mediu unde se găseşte oxid de carbon, se pot produce intoxicaţii grave. Dacă aproximativ 50% din hemoglobina eritrocitului se află sub formă de carboxihemoglobină, nemaifiind posibilă formarea oxihemoglobinei, apar ameţeli, dureri de cap (cefalee), iar dacă procentul de carboxihemoglobină creşte în continuare, se pot înregistra chiar intoxicaţii mortale.

Ambele combinaţii, oxi- şi carboxihemoglobina, se pot transforma prin desfacerea oxigenului, respectiv oxidului de carbon, simultan cu o oxidare a ionului feros la feric, într-un compus denumit *methemoglobină.* În loc de hem, methemoglobina conţine *hemină* (Fe^{3+}), de unde şi culoarea brună ce o caracterizează.

Transformarea hemoglobinei, oxihemoglobinei sau a carboxihemoglobinei în methemoglobină se produce în mod continuu în eritrocit unde se găseşte într-o concentraţie medie de 0,4% din totalul hemoglobinei,

Scanned with OKEN Scanner

constituind o etapă preliminară catabolizării sale. O cantitate limitată de methemoglobină se poate retransforma în hemoglobină sub acţiunea unei enzime denumite methemoglobinreductază.

Concentraţia methemoglobinei nu creşte mai mult de 0,4% din totalul hemoglobinei eritrocitare decît prin introducerea în organism a unor oxidanţi ca fericianură şi azotiţi sau chiar a unor medicamente, cum ar fi antipirina. Combinaţiile hemoglobinei cu gazele au spectre de absorbţie caracteristice, care permit identificarea fiecăreia dintre ele.

Procesele şi combinaţiile ce pot avea loc între hemoglobină şi gaze se pot schematiza astfel (fig. 15) :

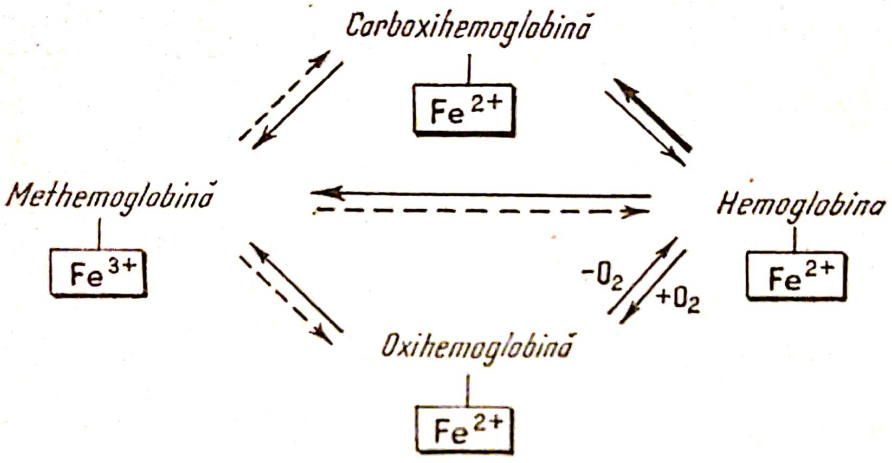


Fig. 15. Combinarea hemoglobinei cu diverse gaze şi valenţa fierului în compuşii rezultaţi.

În afară de rolul de transportor de oxigen, hemoglobina participă şi la procesele care asigură constanţa *p*H-ului sîngelui. Hemoglobina constituie un sistem tampon prin existenţa ei în stare redusă şi oxidată ; în timpul procesului reversibil de acceptare şi de eliberare de oxigen are loc, la nivelul ciclului imidazolic al histidinei din globină, un proces tot reversibil, de disociere. Este vorba, deci, de un joc de creştere sau de scădere a *p*H-ului, dependent de intensitatea proceselor metabolice. Prin intensitatea proceselor metabolice se înţelege cantitatea de CO_2 şi de alţi compuşi formaţi, printre care oxihemoglobina. Eliminarea prin plămîni a CO_2 va determina o creştere a aciditătii, ceea ce va face ca afinitatea hemoglobinei pentru oxigen să crească. Acest proces este strict dependent de intensitatea proceselor oxidative din organism, prin urmare de consumul de oxigen. Bioxidul de carbon format în cursul catabolismului glucidic reacţionează spontan cu apa formînd acidul carbonic (H_2CO_3). Procesul are loc în eritrocit şi este catalizat de către o enzimă denumită anhidraza carbonică, pentru activitatea căreia este necesară prezenţa zincului. Acidul carbonic format, în prezenţa protonilor eliberaţi în timpul jocului hemoglobină ⇌ oxihemoglobină se transformă în ion bicarbonic care va difuza în plasmă.

3.5.1.1.8. *Mioglobina.* Această cromoproteină, denumită şi pigmentul respirator al muşchilor şi care colorează în roşu muşchii striaţi, este formată, după cum s-a menţionat, dintr-un singur lanţ polipeptidic alcătuit din 157 de unităţi de aminoacizi avînd o masă moleculară de 17 000. Structura sa terţiară se aseamănă foarte mult cu a lanţurilor α şi β ale hemoglobinei, al căror precursor ancestral este. Conţine o singură moleculă de hem, deci

Scanned with OKEN Scanner

capacitatea sa de a accepta oxigen este limitată. Principalul rol al mioglobinei este acela de a constitui un depozit de oxigen în mușchi, care se utilizează în cursul unui efort prelungit. De asemenea, mărește posibilitatea de difuzie a oxigenului în celulele musculare.

3.5.1.2. *Citocromii* sînt compuși care fac parte din cromoproteinele porfirinice cu rol respirator ; inițial au fost evidențiați pe cale spectrofotometrică de către MacMunn (1886), apoi Keilin (1925—1929), utilizînd tehnici mai avansate, a pus bazele cunoștințelor noastre actuale, dîndu-le și numele de citocromi (kytos = cavitate, celulă ; chroma = culoare) și clasificîndu-i în citocromi *a*, *b* și *c*, după lungimea de undă la care absorb în mod specific. Tot Keilin a corelat funcția lor cu procesul de respirație celulară.

Cristalizarea citocromului *c* (Boldd, 1955) și definirea structurii sale terțiare (1967) a permis înțelegerea exactă a funcției generale a citocromilor. Astăzi, pentru a-i deosebi de alte substanțe cu structură și cu funcții catalitice asemănătoare, ca peroxidaza și catalaza, se consideră că sînt citocromi acele substanțe care au ca grupare prostetică hem și a căror mecanism de acțiune se bazează pe posibilitatea de a-și schimba reversibil valența fierului, din ion feros în ion feric și invers. Totuși, în categoriile celor trei tipuri de citocromi, alături de numeroșii reprezentanți tipici, sînt încadrați o serie de compuși care se abat mai puțin sau mai mult de la definiția dată. Este cazul citocromului a_3 care conține cupru în loc de fier, a citocromului b_2 care conține flavină în loc de hem și a citocromului $P-450$, care are alte caracteristici distincte. Cu toții au însă activități enzimatice, fiind citocromoxidaze, oxigenaze sau hidroxilaze, iar funcția lor este, în majoritatea cazurilor, aceea de transportori de electroni sau hidrogen.

Clasificarea citocromilor în trei grupe *a*, *b* și *c* după domeniul lor specific de absorbție și anume, în ordine, 580—599 nm, 556—588 nm și 549—551 nm a fost păstrată pînă astăzi ; se menționează că absorbția se datorește sistemului de duble legături conjugate ale hemului, diferențele apărînd prin substituția cu radicali hidrofili specifici și anume : formil, vinil, respectiv etil substituit.

Citocromii a. Cel mai important reprezentant al acestora este citocromul a_3 sau citocrom-*c*-oxidaza, al cărui rol enzimatic este acela de a reoxida citocromul *c* din lanțul transportorilor de electroni. Conține două molecule de hem legate de o proteină cu o masă moleculară de 180 000 a cărei structură primară a fost descifrată ; pe lîngă cei doi ioni de fier conține și doi ioni de cupru. Cuprul este legat covalent de proteină și nu poate fi îndepărtat fără denaturarea ireversibilă a proteinei. Citocromul a_3 este legat structural de membrana mitocondrială, activitatea sa fiind dependentă de integritatea structurală a acesteia. Este inhibat necompetitiv de oxid de carbon, cianuri și azidă de sodiu.

Citocromii b constituie o grupă cu numeroși reprezentanți, dintre care în celulele animale au fost identificați numai citocromii *b*, b_5 și $P-450$.

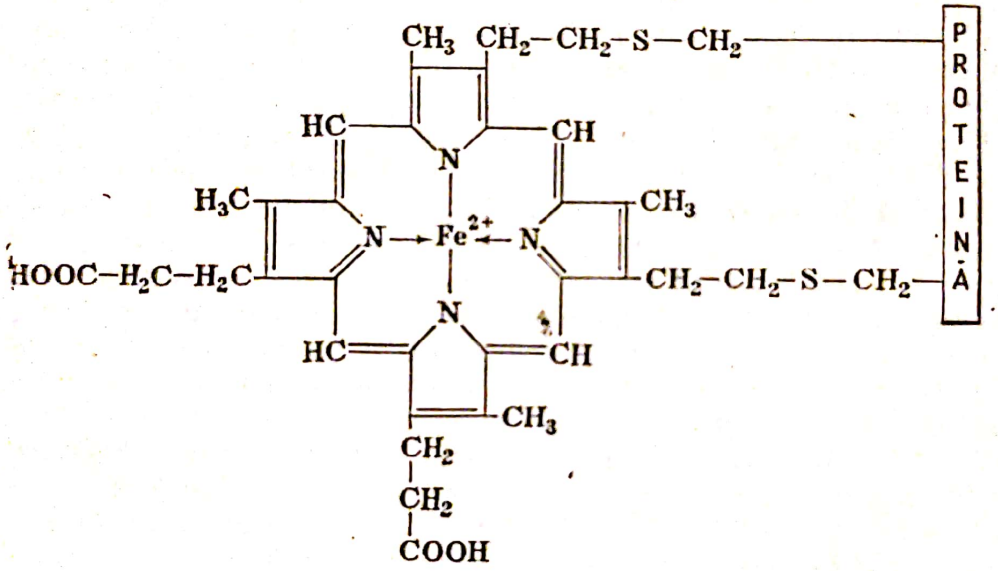
Citocromul *b* participă în lanțul transportorilor de electroni și hidrogen, găsindu-se indisolubil legat de membrana mitocondrială. Structura primară a proteinei sale, cu o masă moleculară de 12 000, nu a fost încă precizată.

Citocromul b_5 se găsește în microzomii mai multor organe, mai ales în cei de ficat, precum și legat de membrana mitocondrială hepatică. Rolul său

biologic este însă destul de puţin precizat ; se pare că reoxidează NADH şi NADPH printr-o acţiune de reductază corelată cu aceea a citocromului *P*—450. În acelaşi timp, în microzomi, acţionează ca transportor de electroni.

Citocromul *P*—450, descoperit în anul 1955, îşi datoreşte numele absorbţiei sale caracteristice la lungimea de undă de 450 nm. Localizat în mod specific în microzomi, are o funcţie deosebit de importantă în procesele metabolismului celular. Participă direct în procesele de oxidare şi de hidroxilare a sterolilor, medicamentelor cu nucleu aromatic, hidrocarburilor alifatice şi aromatice şi a altor compuşi.

Citocromul c este cel mai cunoscut citocrom atît în ceea ce priveşte structura, cît şi funcţia sa. Aceasta se datoreşte faptului că este solubil, termostabil şi rezistent la acţiunea acizilor şi a bazelor, din care motiv a fost obţinut în stare cristalizată din numeroase ţesuturi animale şi vegetale.



Citocrom c

Din tabelul nr. 7 reiese că structura primară a proteinei specifice citocromului *c* diferă relativ puţin în cadrul celor 36 de specii din care a fost obţinut în stare cristalizată, chiar în cazul unor specii complet diferite — mamifere şi drojdii. La cele 11 mamifere din care a fost obţinut în stare cristalizată, din totalul celor 104 aminoacizi care compun proteina, 84 sînt identici, proteina citocromului *c* izolată de la om şi de la maimuţă diferind doar printr-un aminoacid.

Studiile comparative privind structura unor substanţe cu aceeaşi funcţie şi izolate din specii diferite — de exemplu citocromul *c* — au deschis şi au pus bazele unui nou domeniu de cercetare, şi anume al evoluţiei biologice a speciilor.

Determinările cantitative au stabilit că inima are cel mai ridicat conţinut în citocrom *c*, procentul acestuia descrescînd în ordinea : rinichi, ficat, muşchi.

Funcţia sa biologică principală este aceea de a reoxida coenzima *Q* din lanţul transportorilor de hidrogen şi electroni, proces tipic mitocondriei.

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL 7

Compoziția în aminoacizi a unor citocromi *c* din specii diferite (resturi aminoacid/moleculă citocrom *c*)

Aminoacidul	Proveniența citocromului					
	11 specii diferite de mamifere	8 specii diferite de vertebrate nemamifere	3 specii de pești	5 specii de nevertebrate	5 specii de plante superioare	4 specii de drojdie
Gly	12—15	13—14	12—13	10—14	10—12	12—15
Ala	6—17	5—11	7	10—12	7—14	7—12
Val	3— 4	3— 5	4— 6	4— 5	3— 5	1— 5
Leu	6	6	6— 7	5— 8	7— 8	6— 8
Ileu	6— 8	6— 8	3— 4	4— 5	2— 4	2— 5
Pro	3— 4	3— 5	3— 4	5— 6	4— 8	3— 7
Cys	2	2— 4	2	2— 3	2	2— 3
Met	2— 3	1— 2	1— 2	1— 3	1— 3	1— 3
Ser	0— 2	2— 4	4— 5	1— 4	4— 7	3— 6
Thre	7—10	7—10	6— 8	6— 9	7— 8	7— 9
Phe	3— 4	3— 4	3— 4	4— 6	3— 4	3— 6
Tyr	4— 5	4— 5	5	3— 5	5— 6	4— 5
Try	1	1	1— 2	1— 2	1	1
Asp	7—10	7—10	9—10	9—10	8—11	8—13
Glu	9—12	9—12	9—11	8—10	8—12	8—12
Lys	18—19	14—18	16—17	13—15	12—16	12—16
His	3	2— 3	2— 3	1— 3	2— 4	2— 4
Arg	2	2— 3	2— 3	3— 4	2— 4	3— 4

Scanned with OKEN Scanner

Citocromul c_1 este prezent în mai multe formaţiuni subcelulare, dar mai ales în mitocondrii ; este strîns legat de membrane şi participă tot în lanţul transportorilor de electroni şi de hidrogen, făcînd legătura între citocromii *b* şi *c*.

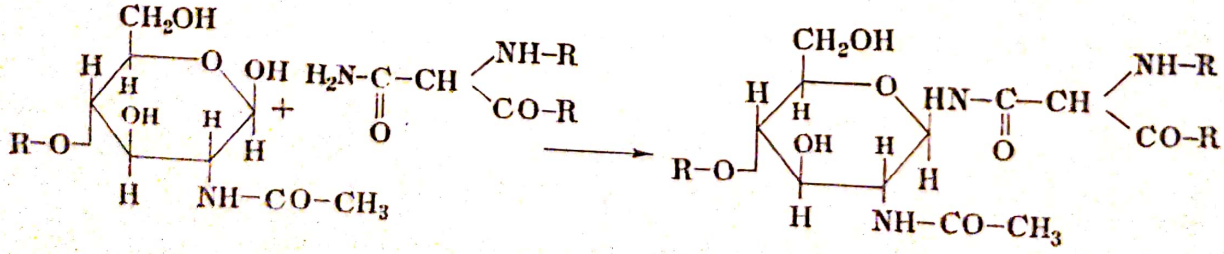
Timpul de înjumătăţire a citocromului *c* este între 10 şi 40 de zile, în funcţie de proveniența sa, cea mai scurtă viaţă avînd-o citocromul *c* din hepatocit, iar cea mai lungă cel din inimă.

3.5.2. GLICOPROTEINELE ŞI MUCOPOLIZAHARIDELE

Aceste două clase de heteroproteine prezintă o mare importanţă pentru organism. Iniţial s-a considerat că există o singură grupă mare de substanţe denumite mucosubstanţe, datorită viscozităţii lor. Ulterior au fost divizate în *glicoproteine* şi *mucopolizaharide*. Diferenţele constau în structura lor, implicit natura ozelor sau a derivaţilor glucidici, în raportul dintre glucide şi proteine, precum şi în tipul de legături care se formează între partea glucidică şi proteine.

Glicoproteinele au un conţinut mai mic de glucide în raport cu mucopolizaharidele, sînt alcătuite mai cu seamă din oze sau glucozamine, legătura dintre partea glucidică şi proteine fiind de tip covalent. Mucopolizaharidele conţin în structura lor glucide şi acizi uronici, partea glucidică fiind legată de proteine atît prin legături ionice, cît şi prin legături covalente, dominînd însă cele ionice.

Glicoproteinele au început să fie studiate cu mai multă insistenţă în ultimii zece ani, după conturarea rolului lor metabolic şi biologic. În structura glicoproteinelor mamiferelor se întîlnesc mai ales următoarele oze sau derivaţi glucidici : galactoză, manoză, uneori glucoză (numai la cîteva tipuri de glicoproteine), 2-N-acetilglucozamină, 2-N-acetilgalactozamină, *L*-fucoză, acizi sialici. La toate glicoproteinele legătura covalentă dintre componentele glucidice şi proteine se realizează între glucozamină sau galactozamină şi asparagina din lanţul polipeptidic :



Glicoproteinele, ca şi mucopolizaharidele dealtfel, sînt constituenţi importanţi ai secreţiilor mucoase, ai ţesutului conjunctiv şi ai cartilagiilor.

Membrana celulară conţine, de asemenea, glicoproteine într-o proporţie ridicată, ceea ce determină într-o mare măsură selectivitatea ei faţă de intrarea şi ieşirea metaboliţilor În urma unei agresiuni determinată de un agent patogen — bacterie sau virus — se produc modificări în structura intimă a membranei, se pare că în special la nivelul acestor glicoproteine, care au ca o imediată consecinţă modificarea permeabilităţii sale. Prin

Scanned with OKEN Scanner

schimbarea unui anumit echilibru metabolic se va produce prin urmare o modificare a caracteristicilor funcţionale ale celulei respective.

Glicoproteinele au fost identificate într-o proporţie ridicată în diverse ţesuturi, unde îndeplinesc funcţii dintre cele mai variate :

— în glanda submaxilară, în salivă ;
— în ser :
  — orosomucoidul (glicoproteină care se găseşte într-o cantitate de 20—40 mg% ;
  — imunoglobulinele, proteine cu rol în imunitate ;
  — fibrinogenul, proteină sintetizată în ficat şi care are rol în coagularea sîngelui ;
  — izoaglutininele, care determină specificitatea de grup sangvin ;
— în intestin, cu rol de protecţie al pereţilor stomacului şi al intestinului ;
— în urină ;
— în ţesutul conjunctiv.

Din punct de vedere medical, glicoproteinele prezintă o importanţă din ce în ce mai mare, dozarea unor componente constitutive, ca de exemplu a acizilor sialici, reprezentînd un test de bază pentru diagnosticul unor maladii aşa cum ar fi diverse procese inflamatorii, reumatism, cancer etc.

Mucopolizaharidele sînt poliozide care conţin în structura lor acizi uronici (glucuronic sau galacturonic), hezozamine (glucozamină, galactozamină), oza putînd fi esterificată cu acid sulfuric sau acetic. Au un caracter acid marcat şi sînt combinate cu diverse proteine specifice, legătura dintre partea neproteică şi cea proteică făcîndu-se în special prin legături coordinative.

Mucopolizaharidele sînt constituenţi importanţi ai ţesutului conjunctiv, în special ai substanţei „fundamentale", material dispus în lame sau în diferite alte forme. Această substanţă fundamentală conţine în structura sa diverse proteine, mucopolizaharide, electroliţi, toate acestea alcătuind un tot complex, încă insuficient de binecunoscut.

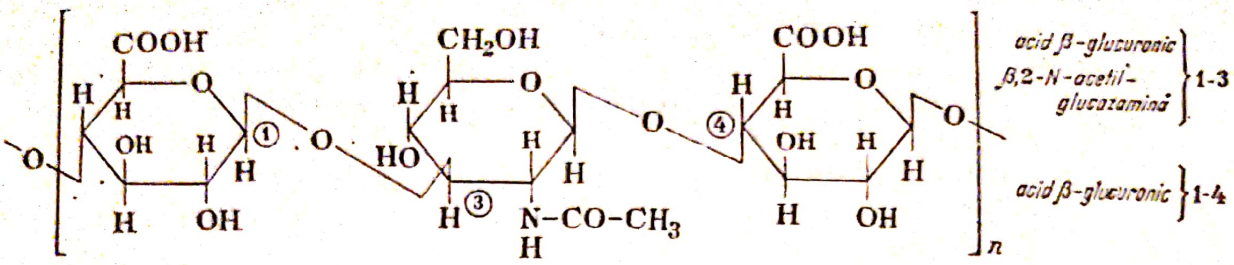
Mucopolizaharidele pot fi clasificate în două grupe mari, după rolul funcţional pe care-l deţin :

— mucopolizaharide de structură : acid hialuronic şi condroitinsulfuric ;
— mucopolizaharide de secreţie : heparină şi heparinsulfat.

Mucopolizaharidele de structură. Acidul hialuronic este un important constituent al pielii, al lichidului sinovial şi pleural, fiind considerat ca un ciment intercelular. Este depolimerizat de către o enzimă denumită hialuronidază care, conţinută în bagajul enzimatic al unor bacterii, permite acestora să pătrundă în interiorul celulelor, anulînd unul din principalele roluri ale acestui acid, acela de a împiedica difuziunea substanţelor străine. Hialuronidaza mai este întîlnită în veninul unor şerpi şi în spermatozoizi. Prezenţa acestei enzime în spermatozoizi se explică prin necesitatea pătrunderii acestora în interiorul ovulului pentru a-l fecunda. Acidul hialuronic are o masă moleculară mare, de 300 000, şi este unit cu o proteină specifică. Structura sa exactă nu a fost precizată, dar se cunosc secvenţe în care, în mod caracteristic, găsim o unitate structurală formată din acid β-glucuronic , β-2-N-acetilglucozamină şi din nou acid β-glucuronic.

Scanned with OKEN Scanner

Legarea între acidul β-glucuronic și β-2-N-acetilglucozamină se face **1-3**, iar între acesta și următoarea moleculă de acid glucuronic este **1-4** :

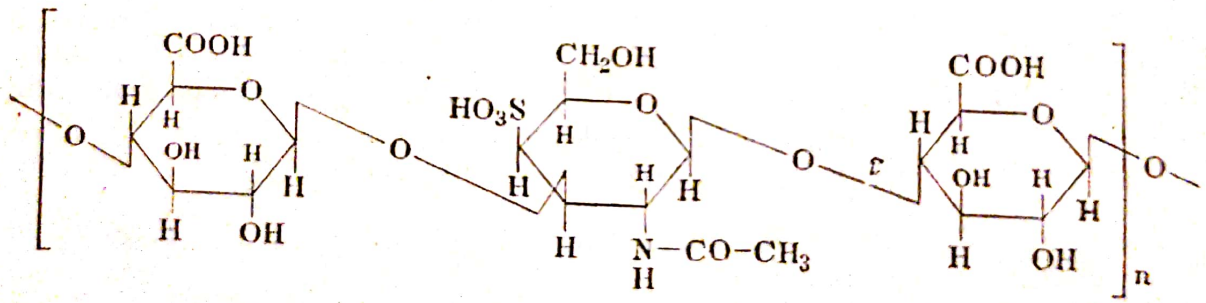


Acizii condroitinsulfurici sînt componente ale cartilagiilor, tendoanelor, aortei etc. Au o masă moleculară în jur de 50 000 și o structură neprecizată, cunoscîndu-se însă unități structurale care au putut pune în evidență mai multe tipuri denumite condroitinsulfați *a*, *b*, *c*.

Ca o caracteristică comună, toți acești acizi conțin în structura lor unități formate din acid β-glucuronic, β-2-N-acetilgalactozamină (legate **1-3**) și o altă moleculă de acid β-glucuronic, legătura cu galactozamina făcîndu-se **1-4**. Toți cei trei acizi conțin acid sulfuric care esterifică, în diferite poziții, hidroxilii alcoolici, de unde și denumirea de condroitinsulfați.

Cei trei acizi diferă între ei prin următoarele caracteristici:

— *acidul condroitinsulfuric a* conține esterificat acidul sulfuric în poziția **4** a β-2-N-acetilgalactozaminei ;



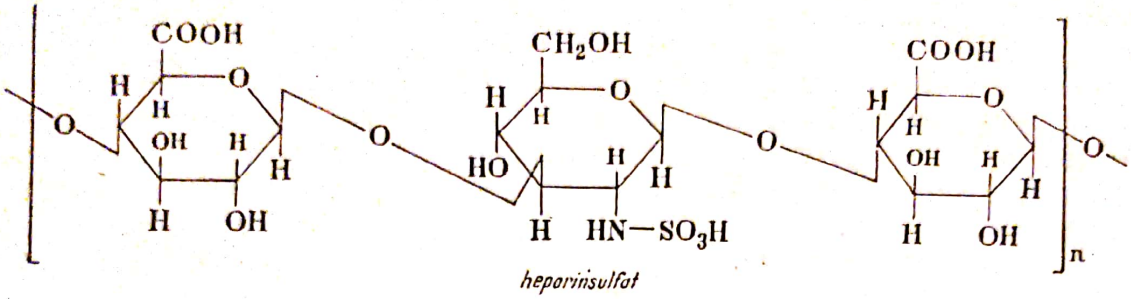
— *acidul condroitinsulfuric b* conține în loc de acid β-glucuronic un izomer denumit acid iduronic, și în poziția C_4 a 2-N-acetilgalactozaminei are $-O-SO_3H$. Se mai numește și dermatansulfat ;

— *acidul condroitinsulfuric c* conține esterificat acidul sulfuric în poziția **6** a β-2-N-acetilgalactozaminei.

Mucopolizaharidele de secreție. Heparina este un puternic inhibitor al procesului de coagulare ; a fost identificată în ficat, miocard, plămîn. Este puternic legată de o proteină specifică, aceasta fiind o lipoproteină. Are în structura ei o unitate constituțională formată din acid α-glucuronic și α-glucozamină legate **1-4**. Glucozamina este esterificată în pozițiile **2** și **6** cu acid sulfuric.

Scanned with OKEN Scanner

Heparinsulfatul sau mucoitinsulfatul, identificat în mucinele gastrice, are o structură asemănătoare cu a acidului hialuronic, diferența constînd în faptul că în locul radicalului acetic se află unul sulfuric :



heparinsulfat

3.5.3. NUCLEOPROTEINELE

Nucleoproteinele sînt formate prin unirea moleculelor proteice cu grupări prostetice reprezentate de acizii nucleici ; proteinele din structura acestor compuși pot fi încadrate în categoria histonelor sau protaminelor, deci sînt proteine cu masă moleculară relativ mică și au un pronunțat caracter bazic.

Denumirea acestor heteroproteine — acizi nucleici, nucleoproteine — se datorează faptului că se găsesc repartizate mai ales în nucleu, de unde au fost extrase pentru prima oară de către M i e s c h e r (1868). Nucleoproteinele sînt întîlnite în absolut toate celulele animale, vegetale, bacterii, precum și în virusuri.

Datorită greutăților întîmpinate în cercetarea acizilor nucleici, substanțe atît de complexe și de ușor de denaturat, cunoștințele noastre despre structura și rolul lor sînt de dată recentă, începînd cu lucrările lui C a s p e r s s o n, B r a c h e t, D a v i d s o n și C h a r g r a f f, apărute după anul 1940. Aceste cercetări au precizat existența a două tipuri principale de acizi nucleici, acizii dezoxiribonucleici (ADN) și acizii ribonucleici (ARN).

Rolul biologic major al acizilor nucleici este de a înmagazina și transmite informația genetică (ADN) și a fi factori indispensabili sintezei tuturor proteinelor (ARN). Relația indisolubilă dintre ADN și ARN a fost definită de către C r i c k (1958) ca *dogma centrală a biologiei moleculare* și constă în faptul că informația genetică înmagazinată în structura ADN-ului din nucleu, este transmisă (*transcripția*) unui tip de ARN care difuzează apoi în citoplasmă, iar după modelul său structural, prin traducere, (*translație*), se sintetizează în mod specific milioanele de proteine ale tuturor organismelor, sinteză care are loc la nivelul reticulului endoplasmatic.

Această dogmă centrală a biologiei moleculare poate fi schematizată astfel (fig. 16 a) :

Această schemă este astăzi completată cu aspecte noi, rezultat al cercetărilor din ultimii ani ca, de exemplu, posibilitatea de a se sintetiza ADN pe matrița de ARN în celulele invadate de unele virusuri, precum și o cale specială de sinteză a proteinelor, care utilizează direct informația ADN (fig. 16 b).

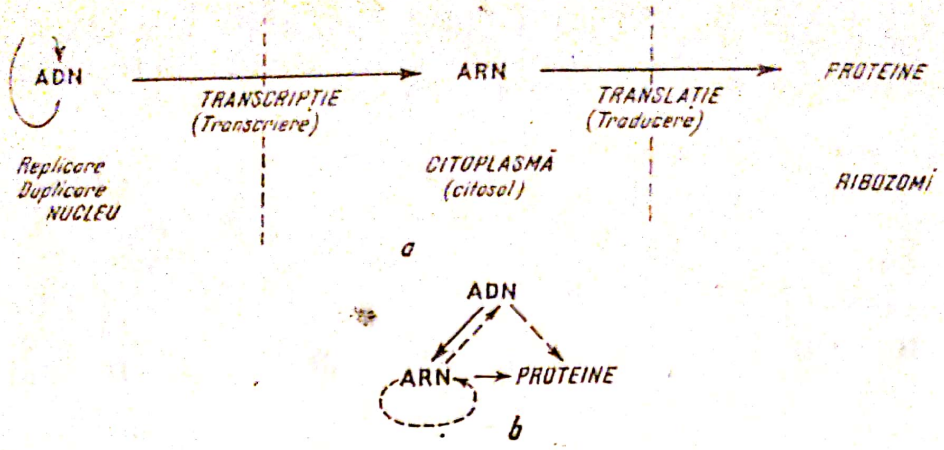


Fig. 16. Corelațiile între ADN, ARN și proteine, în conformitate cu dogma centrală a biologiei moleculare (a) și cu cunoștințele actuale (b).

3.5.3.1. *Componenții structurali ai acizilor nucleici* s-au pus în libertate prin hidroliză chimică menajată și mai ales prin hidroliză sub acțiunea unor enzime specifice, ce acționează numai asupra anumitor tipuri de legături (fig. 17):

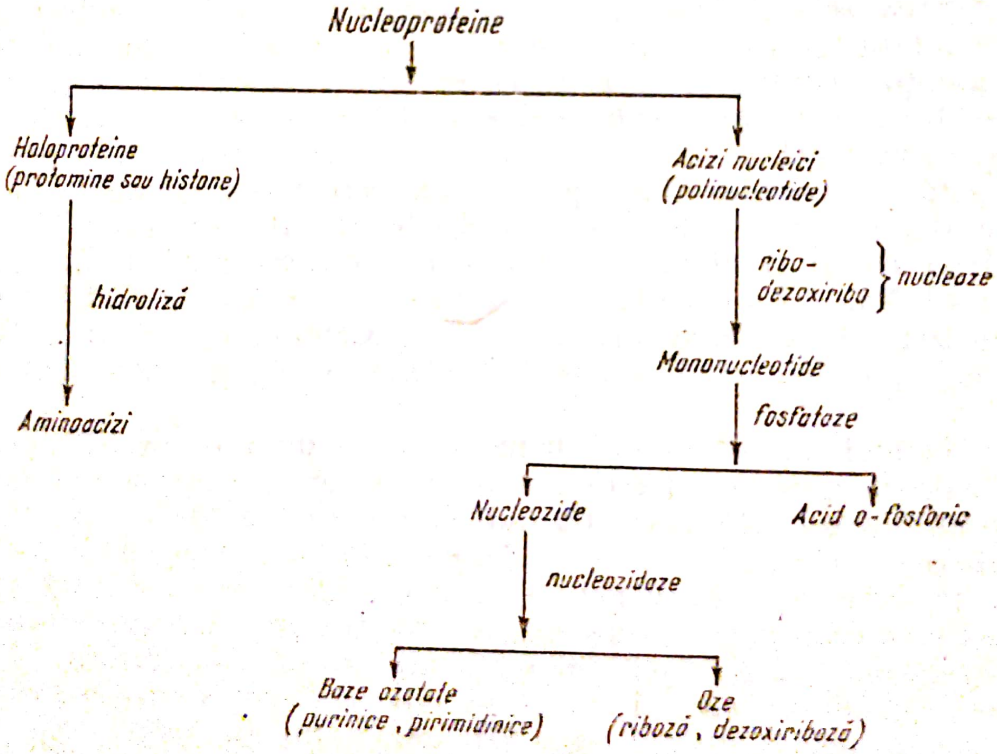


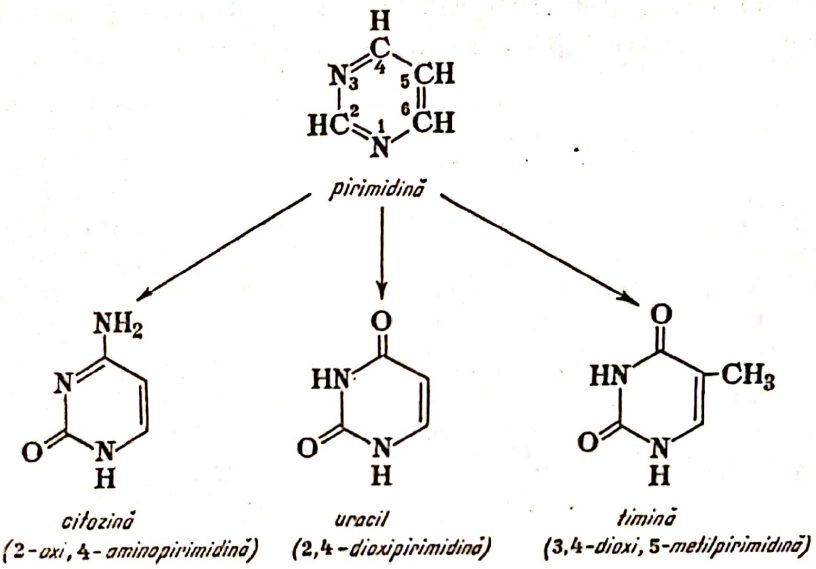
Fig. 17. Degradarea nucleoproteinelor pe cale chimică.

Din schemă reiese că cele două componente de bază ale nucleoproteinelor sînt acidul nucleic și o holoproteină. Acidul nucleic este de fapt un biopolimer format din unirea unui mare număr de nucleotide care, la rîndul lor, sînt formate din baze azotate (purine și pirimidine), o oză (riboză sau dezoxiriboză) și acid fosforic.

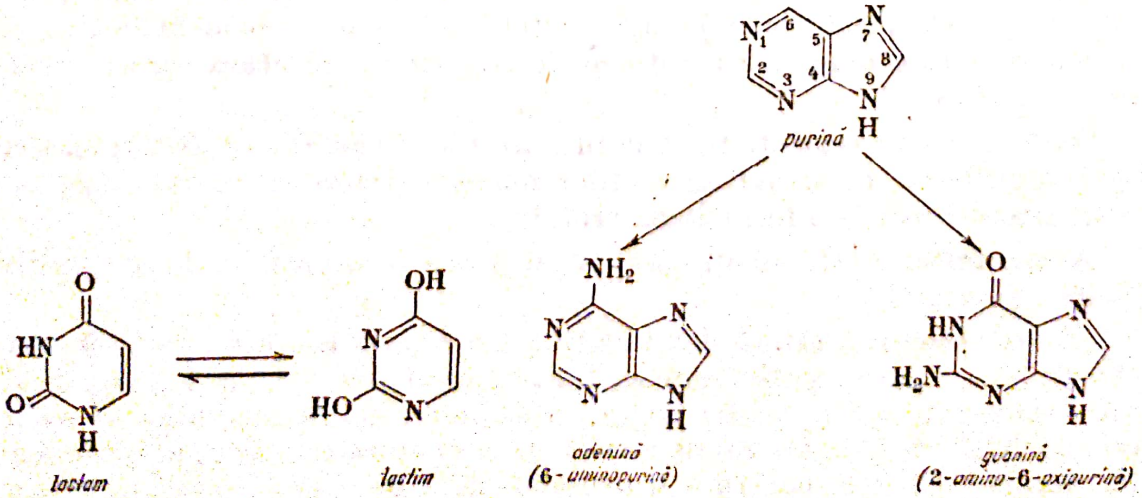
Scanned with OKEN Scanner

Pentru descrierea amănunţită a structurii se va urmări schema de mai sus pornind de la termenii finali ai hidrolizei şi anume de la bazele azotate (purine şi pirimidine) şi ozele respective (riboză sau dezoxiriboză).

Bazele pirimidinice derivă de la un heterociclu de bază, pirimidina, existînd trei reprezentanţi principali, şi anume *citozina*, identificată atît în ADN, cît şi în ARN, *uracilul* — prezent numai în ARN şi *timina* — prezentă numai în ADN. În afară de aceste trei baze pirimidinice, au mai fost identificate — într-o cantitate redusă — o mare varietate de baze speciale conţinînd diverşi radicali ca metil, hidroximetil, hidroxil sau tio. Aceste baze speciale sînt întîlnite, în marea lor majoritate, în diversele tipuri de ARN, în unele cazuri însă chiar şi în ADN (la bacteriofagi).



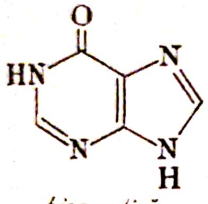
Aceste baze pot exista sub două forme tautomere, aşa-zisele forme *lactam* (*oxi*) sau *lactim* (*hidroxi*), deplasarea echilibrului către una din ele depinzînd de condiţiile fizico-chimice ale mediului, de asocierea cu alţi derivaţi sau baze azotate şi mai ales de *p*H. În celule, bazele pirimidinice ca şi cele purinice dealtfel, care prezintă aceeaşi tautomerie, există practic în exclusivitate sub forma lactam :



Bazele purinice derivă de la heterociclul purină; se disting doi reprezentanţi principali, şi anume *adenina* şi *guanina*, ambele fiind prezente întotdeauna atît în ADN, cît şi în ARN.

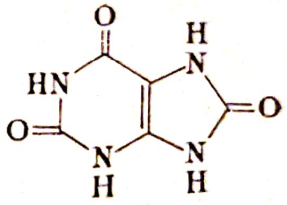
Ca şi în cazul bazelor pirimidinice, în ADN şi ARN au fost identificate — tot într-o concentraţie limitată — o serie de baze purinice speciale conţinînd mai ales radicalul metil.

O serie de alte baze purinice identificate în organism, care nu au o relaţie directă cu structura acizilor nucleici, prezintă totuşi interes biologic. Este vorba de acidul uric, principalul produs al catabolismului bazelor purinice şi de produşii intermediari în obţinerea acestuia, hipoxantina şi xantina; de asemenea, derivaţii metilaţi ai xantinei, şi anume cofeina, teina şi teobromina, care se găsesc în cafea, ceai şi cacao.

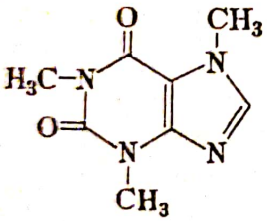


hipoxantină

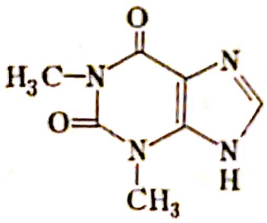
xantină



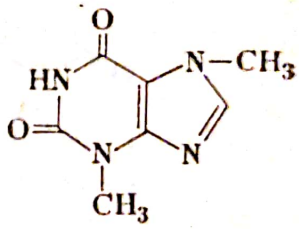
acid uric



cafeină (1,3,7 - *trimetil xantină*)



teină (1,3 - *dimetil xantină*)



teobromină (3,7 - *dimetil xantină*)

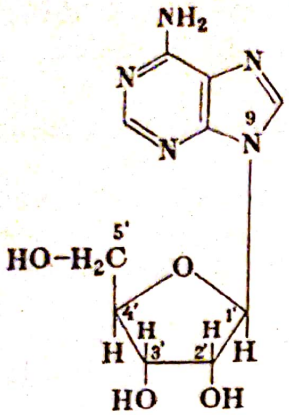
Proprietăţile fizico-chimice ale bazelor purinice şi pirimidinice sînt asemănătoare. Au o solubilitate limitată în apă, un caracter bazic pronunţat şi absorb specific la 260 nm, caracteristică ce permite identificarea şi dozarea spectrofotometrică a tuturor derivaţilor în structura cărora intră bazele azotate.

Ozele care sînt regăsite în structura acizilor nucleici sînt *D*-β-riboza şi *D*-β-dezoxiriboza. În structura acizilor nucleici riboza şi dezoxiriboza se găsesc întotdeauna sub forma izomerului β.

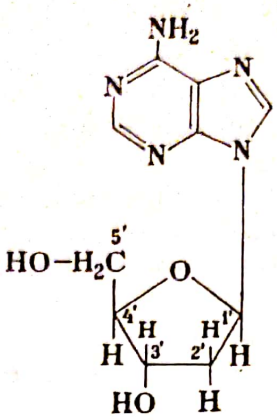
Acidul fosforic este un alt component prezent invariabil în structura acizilor nucleici.

Nucleozidele reprezintă combinaţii între o bază azotată şi riboză sau dezoxiriboză, legarea realizîndu-se între azotul din poziţia 1 din bazele pirimidinice sau 9 din bazele purinice şi hidroxilul semiacetalic al ozei, deci sînt N-glucozide. Atomii de carbon ai ozei din structura nucleozidelor sînt notaţi 1′, 2′ etc. pentru a fi deosebiţi de atomii din structura bazei

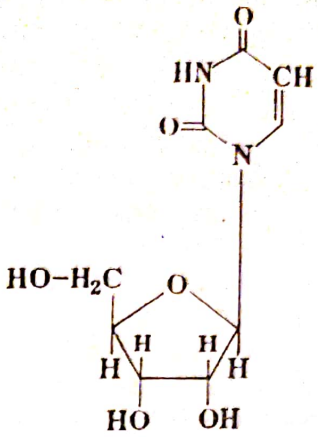
respective :



9-β-ribofuranozid-adenină (adenozină)



9-β-dezoxiribofuranozid-adenină (dezoxiadenozină)



1-β-ribofuranozidouracil (pseudouridină)

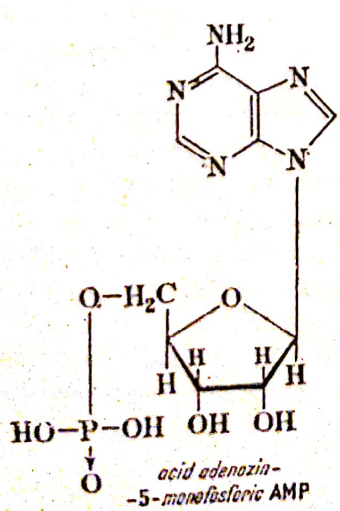
Datorită prezenţei ozelor, nucleozidele sînt mai solubile decît bazele respective; pot fi hidrolizate chimic sau enzimatic sub acţiunea unor nucleozidfosforilaze (nucleozidaze), eliberînd componentele lor.

În categoria nucleozidelor amintim şi despre un component special, *pseudouridina*, care se găseşte în cantităţi mici în unele specii ARN şi în care riboza se leagă de carbonul din poziţia 5 a uracilului.

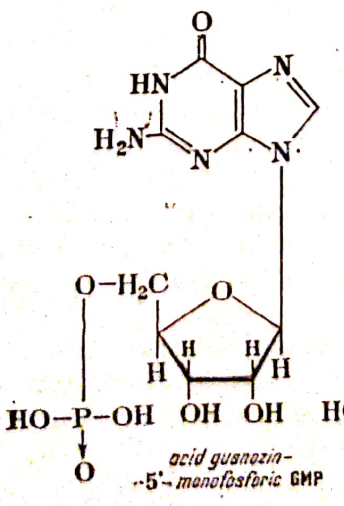
Nucleotidele sînt esterii fosforici ai nucleozidelor, acidul fosforic esterificînd în poziţiile **2′**, **3′** sau **5′** un hidroxil alcoolic al ribozei sau în poziţiile **3′** sau **5′** un hidroxil al dezoxiribozei.

În urma hidrolizei menajate a ADN sau ARN se obţin atît nucleozid-**5′**-monofosfaţi, cît şi nucleozid-**3′**-monofosfaţi, fapt care dovedeşte că aceştia sînt unităţile structurale ale acizilor nucleici.

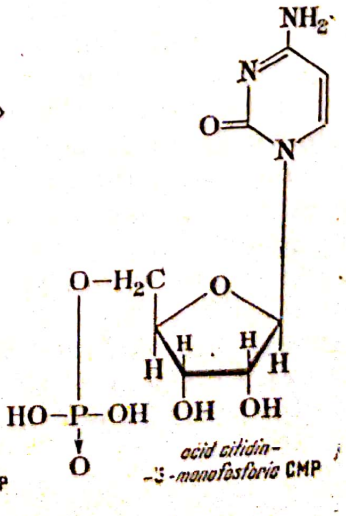
Indiferent de natura bazei azotate constitutive, nucleotidele au un pronunţat caracter acid, datorită prezenţei acidului fosforic, şi absorb puternic la 260 nm.



acid adenozin-5-monofosforic AMP



acid guanozin-5′-monofosforic GMP



acid citidin-3′-monofosforic CMP

Nucleotidele care conţin în structura lor riboză se numesc acid adenozin-5′-monofosforic, acid guanozin-5′-monofosforic etc., cele cu dezoxiriboză sînt denumite acid dezoxiadenozin-5′-monofosforic, acid dezoxiguanozin-5-monofosforic etc. Nucleotidele pot fi prezente în celule în stare liberă sau în combinaţii polinucleotidice.

Rolul biologic general al nucleotidelor, mono-, di- sau trifosfaţilor este deosebit de mare, deoarece :

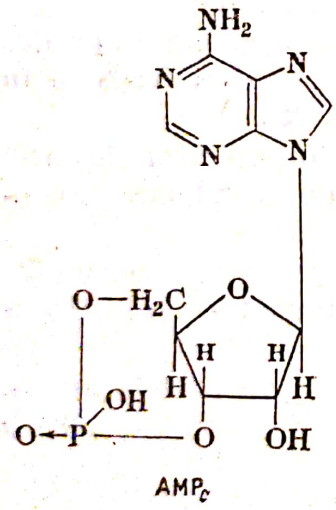
— sînt componentele de bază ale acizilor ribo- şi dezoxiribonucleici ;

— sînt substanţe cu caracteristici energetice deosebite, nucleotidtrifosfaţii, şi mai ales ATP, fiind donatorii universali de energie în toate organismele ;

— participă în mod specific la procesele de biosinteză ale glicogenului (UTP), proteinelor (GTP), fosfolipidelor (CTP) şi în general în toate procesele anabolice (ATP) ;

— intră în structura unor coenzime de mare importanţă pentru organism, ca NAD$^+$, FAD, CoA ;

— sînt substanţele de la care se formează compuşi ce influenţează activitatea unor enzime cu rol de coordonare, şi anume nucleotidfosfaţii ciclici cu reprezentantul de bază AMP$_c$:



AMP$_c$

3.5.3.2. *Structura şi funcţiile acizilor dezoxiribonucleici* au o deosebită importanţă. Moleculele de ADN din toate tipurile de celule conţin patru unităţi nucleotidice, şi anume *d*AMP, *d*GMP, *d*TMP şi *d*CMP, unite prin punţi fosfodiesterice în poziţiile 3′ şi 5′ ale dezoxiribozei. Aceste patru nucleotide formează lanţuri polinucleotidice deosebit de lungi, ADN avînd o structură extrem de polimerizată, implicit mase moleculare foarte mari, de ordinul 10^6 pînă la peste 10^9.

Prin analogie cu modul în care s-a analizat structura proteinelor, se vor descrie în ordine structurile primară, secundară şi terţiară ale ADN.

3.5.3.2.1. *Structura primară.* Secvenţa exactă a nucleotidelor ADN nu a putut fi determinată în nici unul din numeroasele tipuri prezente în celule deoarece : există un număr imens de nucleotide unite între ele prin acelaşi tip de legătură, există un număr ridicat de specii moleculare care nu se pot separa una de cealaltă şi sînt substanţe extrem de labile, simpla pipetare a unei soluţii de ADN înalt polimerizat putînd provoca ruperi ale lanţurilor. Pentru a înţelege complexitatea structurii ADN se dă ca exemplu faptul că într-un lanţ scurt format din numai o sută de nucleotide acestea pot fi aranjate în 4^{100} posibilităţi diferite. De asemenea, apreciind că în ADN-ul din spermatozoid există 10^9 baze, s-a calculat că un astfel de lanţ are o lungime de 10 metri.

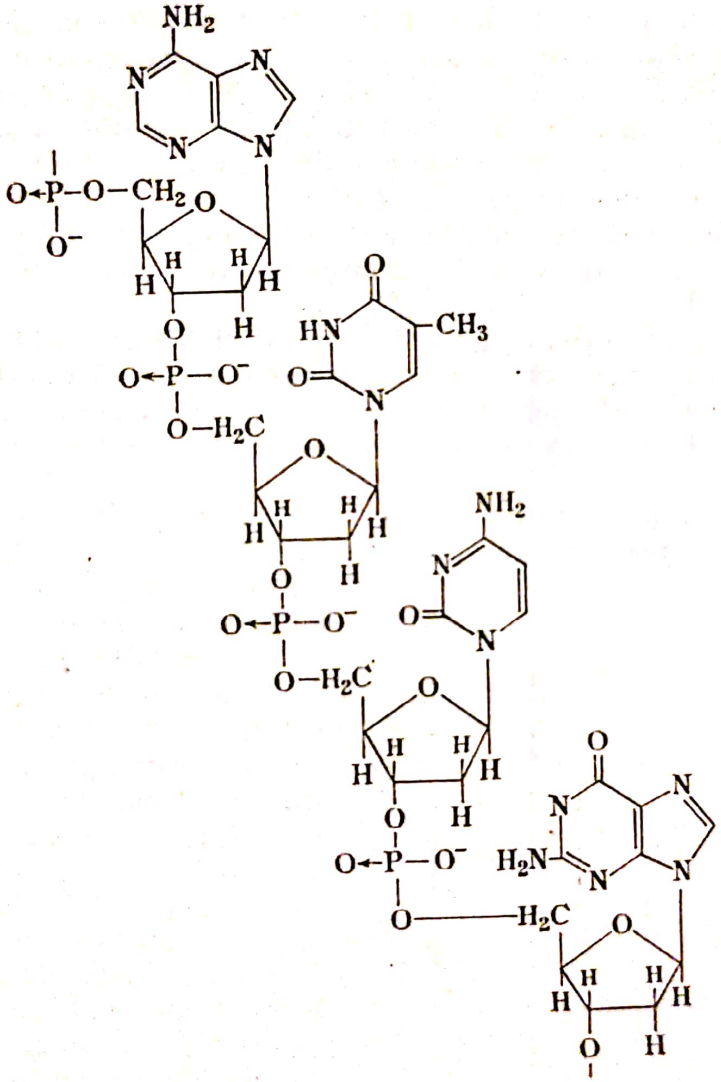
Primele precizări referitoare la structura ADN au fost aduse de către Chargraff (1950—1955), care a constatat o serie de regularităţi şi anume că raporturile adenină/timină şi guanină/citozină sînt egale cu unu :

$$\frac{A}{T} = \frac{G}{C} = 1$$

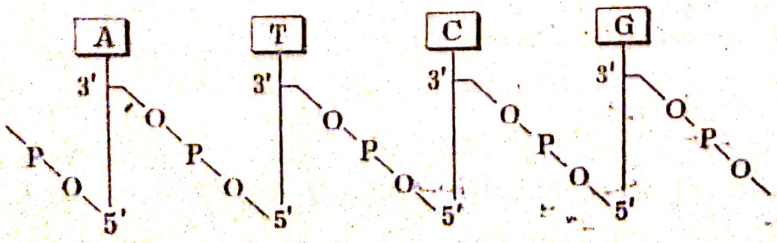
Scanned with OKEN Scanner

Există deci o echivalență strictă între concentrația adeninei și timinei, respectiv a guaninei și citozinei din ADN, raportul $\frac{A+T}{G+C}$ fiind diferit de la specie la specie, mai mult, de la organ la organ. Perechile de baze adenină-timină și guanină-citozină sînt denumite *baze complementare.*

Structura primară a unui lanț polinucleotidic al ADN are formula următoare, în care secvența nucleotidelor este arbitrară deoarece nu este cunoscută :



sau prescurtat :



Legătura fosfodiesterică este desfăcută de enzime specifice, dezoxiribonucleaze, care o pot hidroliza cu formare de nucleozid-3′-monofosfaţi sau nucleozid-5′-monofosfaţi.

3.5.3.2.2. *Structura secundară*. A fost precizată prin utilizarea acelorași tehnici care au definit și structura proteinelor, difracţia cu raze X și hidroliza fracţionată. Bazaţi pe datele obţinute de Astbury și mai ales de Wilkins, între anii 1947—1950, Watson și Crick au făcut presupunerea (1953) că moleculele de ADN sînt formate din două lanţuri polinucleotidice care se înfăşoară unul în jurul celuilalt, faţă de o axă comună, formînd un dublu helix. Structura dublu helicoidală este stabilizată de punţile de hidrogen care se formează între bazele complementare, și anume între adenină-timină și citozină-guanină, situate întotdeauna perpendicular pe axa comună și faţă în faţă pe cele două lanţuri. Datorită acestui cuplaj, secvenţa nucleotidelor de pe un lanţ este complimentară secvenţei nucleotidelor de pe lanţul opus.

De exemplu, dacă secvenţa bazelor dintr-un lanţ este A—C—C—G—A, secvenţa bazelor din lanţul complementar va fi întotdeauna T—G—G—C—T.

Cu ajutorul difracţiei cu raze X s-a stabilit că distanţa în lungul axei între două perechi succesive de baze este de 3,4 Å și că fiecare pereche de baze este rotită faţă de perechea aşezată imediat dedesubt (sau deasupra) cu 36°, ceea ce face ca la fiecare spiră să existe exact 10 perechi de baze azotate.

Cele două lanţuri unite labil prin punţile de hidrogen ce se stabilesc între bazele complementare, au sensuri opuse de derulare, deoarece în timp ce un lanţ are legăturile internucleotidice decurgînd de la 3′ la 5′, celălalt le are invers, de la 5′ la 3′. Pentru înţelegere, se prezintă diferite formulări care redau mai mult sau mai puţin schematic modul de legare internucleotidic și structura dublu helicoidală a ADN (fig. 18). În aceste formulări nu apar decît cele două lanţuri polinucleotidice, dar trebuie subliniat și faptul că *in vivo* există în mod obligatoriu încă alte două componente, și anume o componentă proteică și apă. Proteinele, care au o structură α-helicoidală, înconjoară cele două lanţuri polinucleotidice și le conferă atît stabilitate mărită, cît și specificitate strictă de manifestare în procesele de replicare și de transcriere, iar apa participă la orientarea și stabilizarea legăturilor dintre baze.

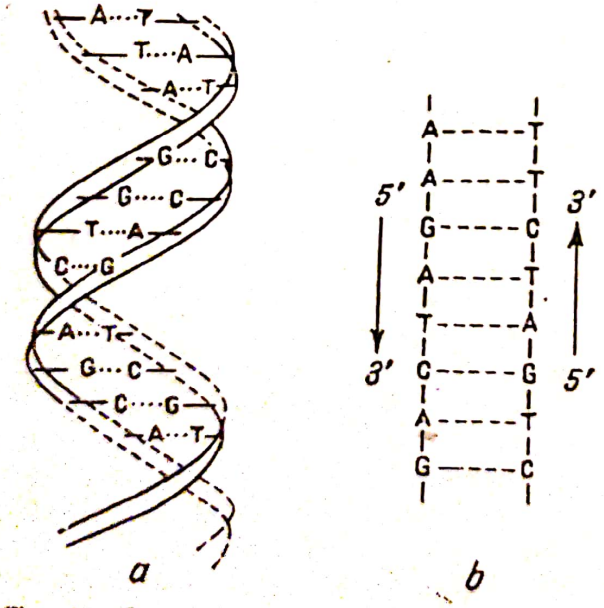


Fig. 18. Structura dublu-helicoidală a ADN, cu cuplarea bazelor azotate (a). Reprezentarea simplificată a aceleiași structuri (b).

Structura dublu helicoidală nu este riguros rigidă, fiind menţionate în literatură o serie de condiţii care fac posibilă o distorsionare reversibilă a celor două lanţuri.

Scanned with OKEN Scanner

3.5.3.2.3. *Structura terțiară*. Forma de ansamblu a macromoleculei a putut să fie precizată numai la ADN extras din mai multe tipuri de virusuri, din mitocondrii și dintr-o serie de bacterii, ADN din aceste surse avînd mase moleculare mai mici, deci fiind mai ușor de extras fără a fi supus denaturării. ADN de origine animală, avînd mase moleculare deosebit de mari mergînd pînă la 20 de milioane, nu a fost posibil să se extragă fără denaturare.

Studiile efectuate cu ADN viral și mitocondrial purificat au arătat că acesta poate exista într-o formă liniară (cu capetele libere) și într-o

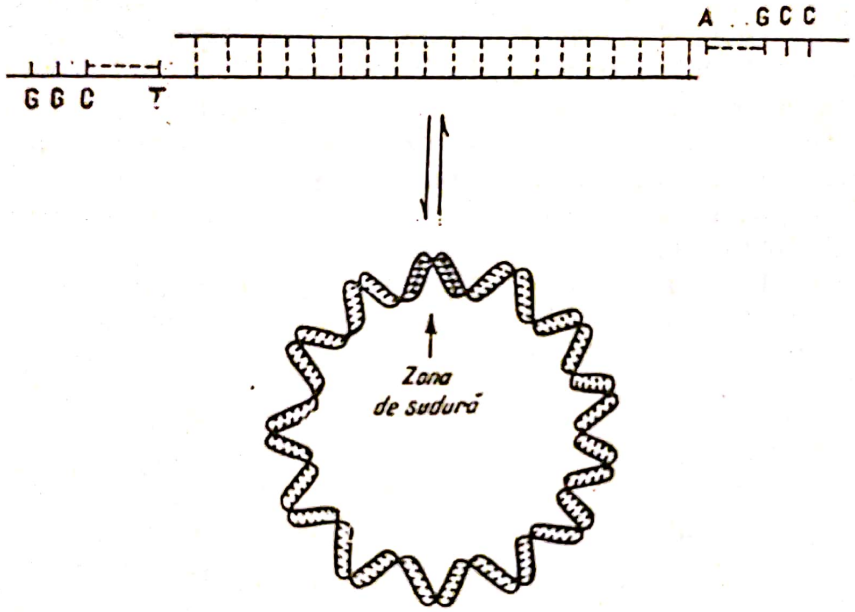


Fig. 19. Forma circulară a ADN, rezultată din forma liniară prin curbare și „sudarea" capetelor sub acțiunea unor enzime specifice.

formă circulară (capetele fiind „sudate"). În prezent se știe că cele două forme sînt interconvertibile : astfel ADN injectat de fagi în bacterii este liniar (pentru a putea trece prin coada îngustă a fagului), în timp ce în interiorul celulei gazdă el este circular. Se pare că forma circulară este cea mai potrivită pentru duplicare (fig. 19).

Dacă structurile secundară și terțiară se pot modifica fără a se pierde nimic din proprietățile biologice ale ADN (este vorba, evident, de unele modificări reversibile, nu de denaturări), structura primară (secvența bazelor) nu se modifică atîta vreme cît condițiile din celule sînt cele normale ; unii agenți fizici sau chimici (radiațiile, acidul azotos) pot transforma unele baze în altele (de exemplu, citozina în uracil), ceea ce corespunde cu modificări în secvența nucleotidelor. Consecința acestor modificări este sinteza de proteine în care secvența aminoacizilor nu este cea normală.

Cele două lanțuri ale ADN se pot desface în interiorul nucleului, deci în condiții compatibile cu viața, sub acțiunea unor enzime ; secvența nucleotidelor de pe fiecare lanț va servi ca tipar pentru sinteza de lanțuri complementare, iar procesul se numește duplicare sau replicare (vezi „Bio-

sinteza acizilor nucleici"). Este însă posibil ca pe fiecare lanţ de ADN să se sintetizeze un alt lanţ în care dezoxiriboza este înlocuită cu riboza, iar timina cu uracilul, formîndu-se acizi ribonucleici. Procesul se numeşte transcriere, copiere, iar ARN format va difuza în citoplasmă şi va participa la procesul de biosinteză a proteinelor.

3.5.3.3. *Structura şi funcţiile acizilor ribonucleici* variază în limite largi. Acizii ribonucleici pot fi împărţiţi în trei tipuri principale : *acizi ribonucleici ribozomali* (ARN_r), *acizi ribonucleici de transfer* (ARN_t) — sau după o denumire mai puţin utilizată acizi ribonucleici solubili (ARN_s) — şi *acizi ribonucleici mesageri* (ARN_m). Aceşti acizi ribonucleici se găsesc în următoarele proporţii faţă de ARN citoplasmatic total : ARN_r 80%, ARN_t 15% şi ARN_m 5%. De subliniat că toate tipurile acestea de ARN sînt sintetizate după tiparul ADN din nucleu.

În ceea ce priveşte structura lor, sînt formaţi din lanţuri polinucleotidice, conţinînd ca unităţi structurale ribonucleotidmonofosfaţi uniţi fosfodiesteric, în 3′ şi 5′. Bazele azotate identificate în structura ARN sînt adenina, guanina, citozina şi uracilul, precum şi bazele speciale de care s-a amintit anterior.

3.5.3.3.1. *Acizii ribonucleici ribozomali* (ARN_r). Au mase moleculare mari ($0{,}7.10^6$—$1{,}8.10^6$); sînt monocatenari, dar pe anumite porţiuni lanţul se înfăşoară, formînd o structură secundară asemănătoare celei a ADN. Sînt componente ale unor particule citoplasmatice distincte denumite *ribozomi*, particule formate în proporţie de 65% din ARN, restul de 35% reprezentînd proteine specifice. Aceste formaţiuni subcelulare au fost identificate pentru prima oară de către cercetătorul de origine română P a l a d e (laureat al premiului N o b e l pentru medicină pe anul 1975) cu ajutorul microscopiei electronice şi au primit iniţial chiar denumirea de *corpusculii Palade* (1948).

Ribozomii sînt formaţi din două unităţi de mărimi diferite, care conţin două tipuri de ARN_r, diferenţiate prin masa moleculară. Funcţia biologică a celor doi ARN_r nu este încă cunoscută. Datorită mărimii diferite, cele două unităţi ribozomale sedimentează la ultracentrifugare cu viteze deosebite. S-a constatat că ribozomii umani au următoarele constante S v e d b e r g (S) pentru cele două subunităţi : 30—40 S pentru subunitatea mai mică şi 50—60 S pentru subunitatea mai mare.

În afară de cele două tipuri de ARN_r conţinute în cele două subunităţi ribozomale, au mai fost identificaţi o serie de alţi ARN_r cu masă moleculară mică, formaţi din 120—150 de nucleotide ; pentru unii din ei structura primară a fost precizată (1968—1971). Cele două subfracţiuni ribozomale conţin 25—40, respectiv 60—100 molecule de proteine diferite indispensabile funcţiei ribozomilor în procesul de sinteză a proteinelor.

3.5.3.3.2. *Acizii ribonucleici de transfer* (ARN_t, ARN_s). Au mase moleculare mici, 23 000—28 000, deci sînt formaţi în medie din 80 de nucleotide, şi au rolul de a transporta aminoacizii din citoplasmă spre locul în care se vor sintetiza proteinele, reticulul endoplasmatic. Fiecărui aminoacid, din cei 22 care sînt identificaţi în structura proteinelor, îi corespunde unul sau mai mulţi ARN_t specifici.

În anul 1965, H o l l e y şi colab. săi au reuşit să determine pentru prima dată structura primară a ARN_t specific alaninei, pentru care s-a acordat premiul N o b e l pentru medicină în anul 1968.

Scanned with OKEN Scanner

Cercetările efectuate pe un număr însemnat de ARN_t obținuți în formă înalt purificată au precizat mai multe caracteristici generale ale acestora. S-a constatat astfel că sînt formați de un număr cuprins între 75 și 90 de nucleotide dispuse într-un singur lanț, la unul din capetele terminale găsindu-se de obicei GMP, avînd hidroxilul din poziția 5′ liber, iar la celălalt capăt au un triplet format din următoarele nucleotide CMP—CMP—AMP (C—C—A) cu hidroxilul 3′ al ribozei liber. De acest hidroxil se va lega un anumit aminoacid care astfel va fi transportat pînă la locul unde se desfășoară sinteza proteinei. Lanțul polinucleotidic formează pe anumite porțiuni zone asemănătoare dublului helix, care sînt întrerupte datorită prezenței în secvența ARN_t a unor baze speciale — baze metilate, pseudouridină etc. Forma acestui lanț, schematizată, are aspectul unui trifoi, distingîndu-se în mod suplimentar și un așa-numit extrabraț.

În partea opusă celor două capete ale lanțului se găsește un triplet denumit *anticodon*, specific fiecărui aminoacid, și care are o corespondență — un triplet format din bazele complementare — într-o anumită secvență a ARN_m (fig. 20).

ARN_t au fost astăzi obținuți cu toții în stare purificată și li se cunoaște cu exactitate structura primară, secundară și terțiară.

3.5.3.3.3. *Acizii ribonucleici mesageri* (ARN_m). Reprezintă doar 5% din totalul acizilor ribonucleici celulari. Au o compoziție în baze azotate identică cu aceea a ADN, diferența constînd în prezența uracilului în locul timinei. Se numesc ARN mesageri pentru că acești acizi nucleici fac ca mesajul genetic memorat în secvența nucleotidelor din structura ADN să se concretizeze prin sinteza specifică a tuturor proteinelor celulare. Nu li se cunoaște structura primară ; se pare că nu formează zone asemănătoare dublului helix, deci nu au structură secundară. Studiul lor este îngreunat de faptul că sînt extrem de labili, greu de extras, se găsesc într-o cantitate foarte mică și au o viață foarte scurtă.

În tabelul 8 se prezintă comparativ principalele caracteristici ale acizilor ribo- și dezoxiribonucleici.

3.5.3.4. *Protaminele și histonele* reprezintă holoproteinele care intră în compoziția nucleoproteinelor. Sînt proteine cu mase moleculare mici, în jur de 2 000, cu un caracter bazic pronunțat, determinat de prezența într-o cantitate mare a aminoacizilor diaminomonocarboxilici— arginină și lizină — precum și a tirozinei. Lanțurile polipeptidice ale proteinei sînt dispuse de-a lungul celor două lanțuri ale ADN urmîndu-i conturul helicoidal. Sînt menținute de lanțurile polinucleotidice datorită legăturilor electrostatice care se creează între sarcina negativă a grupării fosfat și sarcina pozitivă a aminei libere din aminoacizii diaminomonocarboxilici. Rolul biologic al acestor proteine nu este precizat cu toată claritatea, dar se crede că sînt implicate în procesele de replicare, transcriere și de sinteză a proteinelor.

3.5.3.5. *Acizii nucleici virali* sînt astăzi deosebit de studiați ; există de aceea cunoștințe referitoare la structura și modul prin care se înmulțesc în celula gazdă. De altfel, pentru cercetări efectuate în acest domeniu, Baltimore, Dulbecco și Temin au luat, în anul 1973, premiul Nobel pentru medicină. Virusurile se consideră a fi situate la granița vieții, la limita dintre viu și neviu. Au mase ale particulelor echiva-

Scanned with OKEN Scanner

lente uneori cu ale unor molecule de biopolimeri, cuprinse de la mai puțin de 10^6 pînă la peste 10^8. Sînt constituite din complexe supramoleculare stabile, putînd fi extrase, purificate și chiar obținute în stare cristalină ;

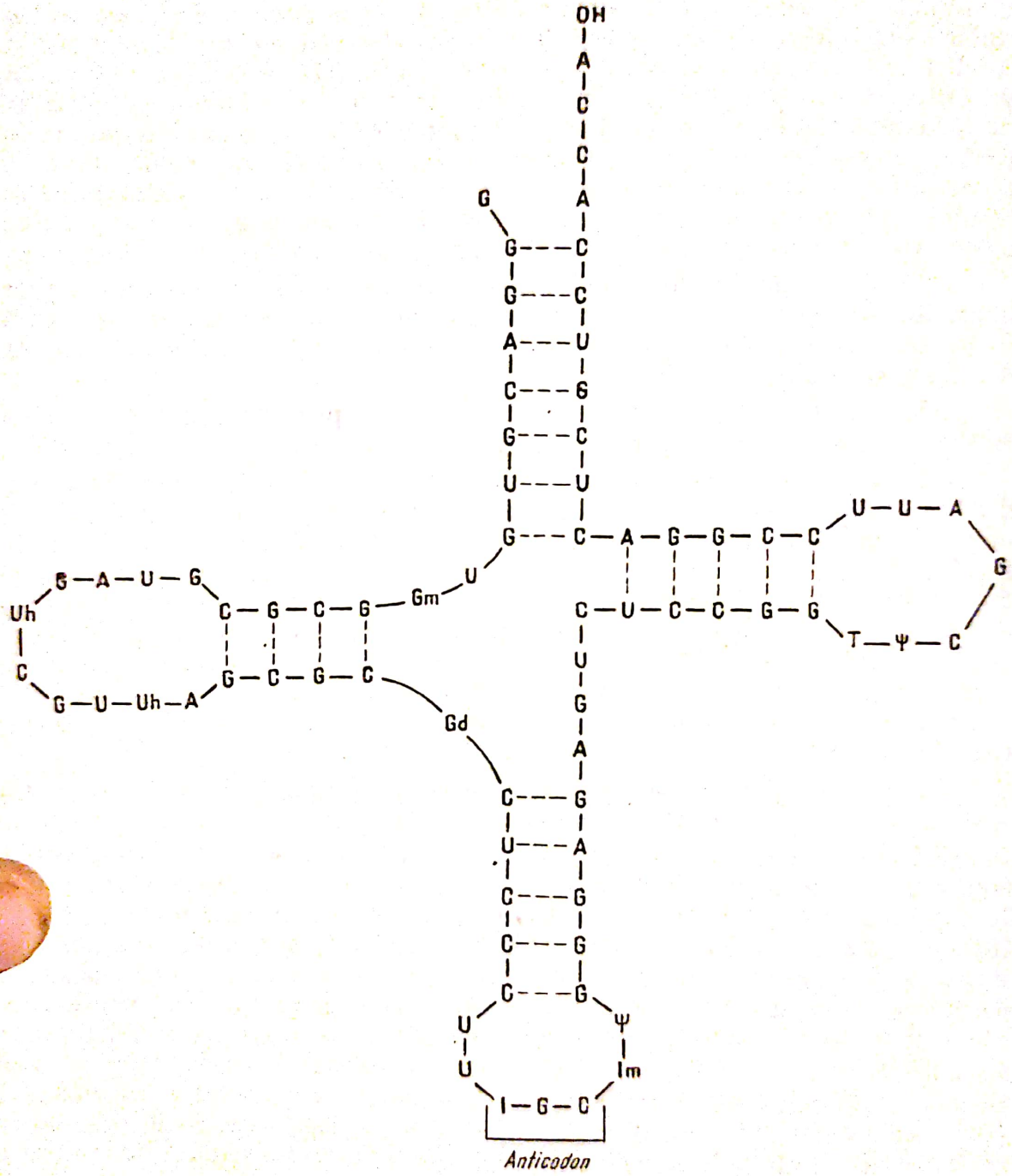


Fig. 20. Structura ARN_t ; conține, în afara A, C, G, U și alte nucleotide : T, Uh, Gm, Gd, Im.

conțin proteine specifice într-o proporție de 50—99% în funcție de virusul respectiv. Conțin, de asemenea, ADN sau ARN, niciodată ADN și ARN împreună. Dintre virusurile ADN se citează virusul herpesului, adenovirusurile, și virusuri ale unor tipuri de tumori. Virusuri ARN sînt

virusul poliomelitic, virusurile gripale, virusul sarcomului Rous care provoacă tumori ale ţesutului conjunctiv la găini.

Structura acizilor nucleici virali este variabilă, şi anume mono- sau bicatenară, liniară sau ciclică, depinzînd de la virus la virus.

Virusurile nu se pot multiplica decît în interiorul unei celule gazdă.

TABELUL 8

Structura, localizarea şi proporţia de ARN şi ADN în celule

	ARN_r	ARN_t	ARN_m	ADN
Oza	riboză	riboză	riboză	dezoxiriboză
Bazele azotate	A G C U	A G C U baze speciale	A G C U	A G C T
Structura	neprecizată	dublu helix parţial	liniară	dublu helix
Număr de baze (aproximativ)	1.000 — 3.500	75—90	1.000 — 1.500	milioane
Masă moleculară (aproximativ)	700.000—1.800.000	23.000—30.000	700.000—900.000	$10^6 - 10^9$
Repartiţie celulară	citoplasmă	citoplasmă	citoplasmă	nucleu (cromozomi)
Procent din totalul ARN celular (aproximativ)	80%	15%	5%	—

Scanned with OKEN Scanner

4 VITAMINE ŞI COENZIME

Glucidele, lipidele şi proteinele sînt compuşi necesari în cantităţi mari organismului uman, deoarece prin degradarea lor se eliberează atît energie, cît şi substanţe mai simple care constituie puncte de plecare în sinteza unei imense varietăţi de alte substanţe.

În capitolele precedente s-a arătat că unii acizi graşi nesaturaţi şi unii aminoacizi nu pot fi sintetizaţi de organismul uman, motiv pentru care au fost denumiţi acizi graşi esenţiali, respectiv aminoacizi esenţiali.

Pe baza cunoştinţelor actuale se poate afirma că şi alte substanţe de extremă necesitate nu pot fi sintetizate de organismul uman, chiar dacă este vorba de cantităţi foarte mici, şi obligatoriu trebuie să fie procurate prin alimente. Acest grup de substanţe a primit denumirea de *vitamine*, adică amine indispensabile vieţii. Numele este motivat prin faptul că aproape toate au grupări amino în moleculă şi prin aceea că absenţa totală din alimente determină afecţiuni grave care pot duce chiar la moarte.

Sursele de vitamine sînt vegetale, animale, microorganisme; de exemplu drojdia de bere, ouăle, ficatul etc.

Unele vitamine nu sînt procurate sub formă activă, ci sub forma unor compuşi înrudiţi numiţi provitamine, care la nivelul organismului sînt uşor transformaţi în vitamine.

Din punct de vedere structural, vitaminele aparţin unor clase foarte diferite. De asemenea, funcţia lor în procesele biochimice la care participă nu prezintă ca similitudine decît faptul că multe constituie partea activă a unor enzime, numindu-se corespunzător *coenzime*.

Criteriul ales pentru clasificare este acela al solubilităţii. Se disting:

— vitaminele liposolubile (solubile în lipide): vitaminele A, D, E, K;

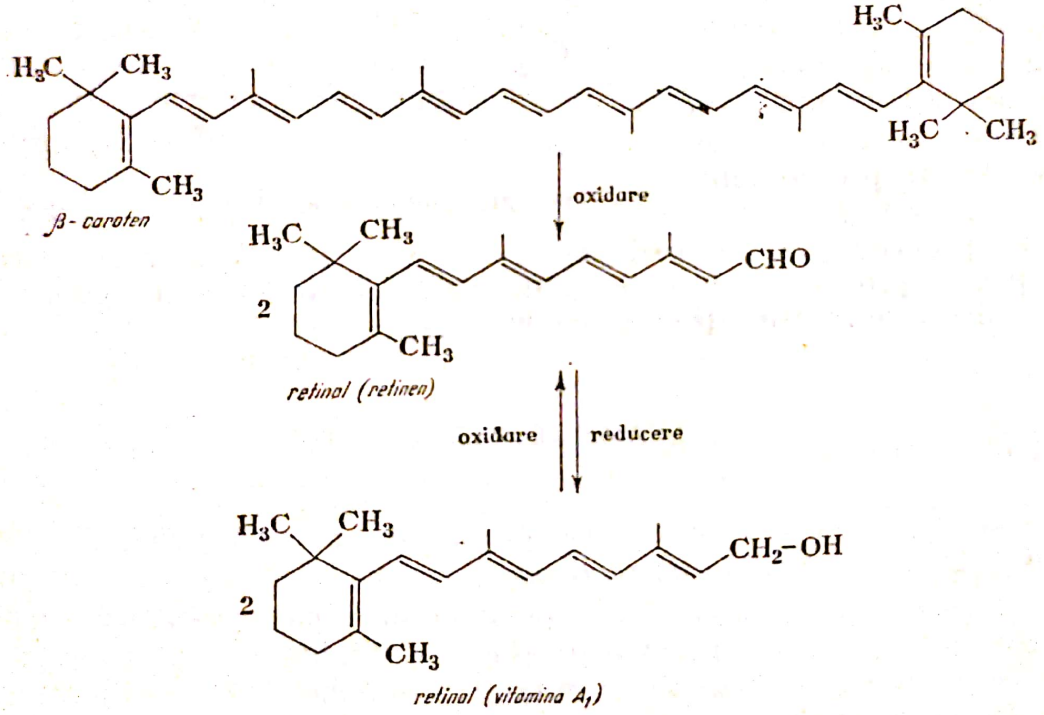
— vitamine hidrosolubile (solubile în apă): vitaminele B (B_1, B_2, B_6, B_{12}), acidul pantotenic, biotina, nicotinamida, acidul folic, PAB, vitaminele P, vitamina C.

4.1. VITAMINELE LIPOSOLUBILE

4.1.1. VITAMINELE A (AXEROFTOLII)

În organismele animale vitaminele A sînt eliberate din carotenii proveniţi din frunzele plantelor verzi, din fructe şi legume.

Principalii caroteni sînt notaţi cu α, β şi γ, fiind în esenţă produşi de polimerizare ai izoprenului la care cele două capete sînt închise sub forma unui ciclu de iononă. Diferenţele între carotenii α, β şi γ constau în numărul dublelor legături din cele două inele de tip ononic. Cel mai important este β-carotenul din care se obţine vitamina A. Transformarea are loc la nivelul peretelui intestinului sub acţiunea enzimei numită carotenază. Procesul nu este o simplă hidroliză, ci o oxidare cu obţinerea aldehidei numită *retinen*, urmată de o reducere, cînd se obţine forma alcoolică numită *retinol* :



Vitamina A_2 diferă de vitamina A_1 prin aceea că are o dublă legătură în plus în ciclul ononic.

Lipsa din alimente a vitaminelor A se traduce prin tulburări ale creşterii în înălţime şi greutate, fiind afectată mai ales dezvoltarea vaselor şi cartilagiilor. De asemenea, sînt alterate funcţional celulele epiteliale şi se produce keratinizarea tractului genital.

Foarte grave sînt tulburările generate de lipsa vitaminelor A în procesul vederii. Formele uşoare se manifestă prin scăderea acuităţii vizuale, lipsa adaptării la întuneric sau alterări în distingerea culorilor (hemeralopie). Formele grave sînt cunoscute sub numele de xeroftalmie şi keratomalacie, şi sînt caracterizate prin leziuni şi keratinizări ale corneei.

Scanned with OKEN Scanner

Rolul vitaminei A în procesul vederii este binecunoscut. Sub forma de retinen (aldehidică), cuplată cu proteine specifice (*opsina*) ea alcătuiește pigmenții fotosensibili din conuri și bastonașe, numiți *rodopsină* și *iodopsină*. În rodopsină, opsina se leagă de retinen numai dacă dubla legătură din poziția 11—12 are configurația *cis*. Sub acțiunea unei cuante de lumină are loc trecerea retinenului în forma *trans*, urmată de desprinderea sa de opsină. Aceste transformări sînt asociate cu producerea influxului nervos. Pentru recepția unei noi cuante este necesară refacerea rodopsinei. Transformarea retinenului *trans* în retinen *cis* poate să se producă fie printr-o reacție fotochimică, fie prin reducerea prealabilă, sub acțiunea unei retinenreductaze, la retinol, care trece în sînge. Aceste procese sînt schematizate în figura 21.

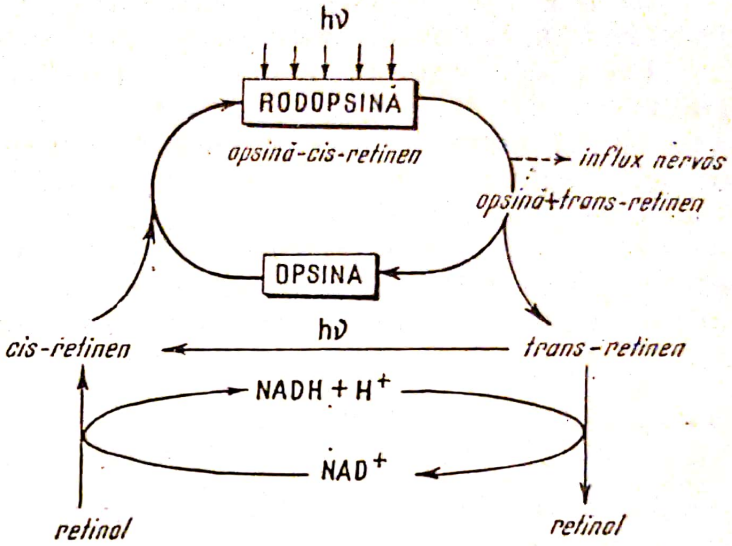


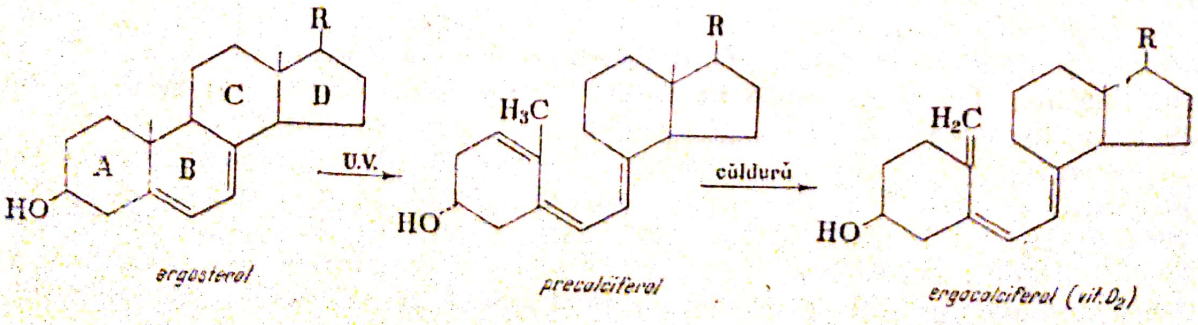
Fig. 21. Rolul vitaminei A în procesul vederii.

De proprietățile oxidoreducătoare ale vitaminei A, a căror însemnătate pentru procesul vederii reiese din cele de mai sus, sînt legate foarte probabil și alte însușiri specifice ale acesteia.

4.1.2. VITAMINELE D (CALCIFEROLII)

Provitaminele D sînt o serie de steroli ca *ergosterolul*, *7-dehidrocolesterolul*, *7-dehidrostigmasterolul* etc.

Formarea vitaminelor D din provitaminele corespunzătoare are loc sub acțiunea radiațiilor ultraviolete și a căldurii. Transformarea implică o serie de reacții intermediare în cursul cărora inelul *B* al ciclopentanoperhidrofenantrenului se rupe, metilul din poziția 10 devenind metilen. De exemplu în cazul ergosterolului :



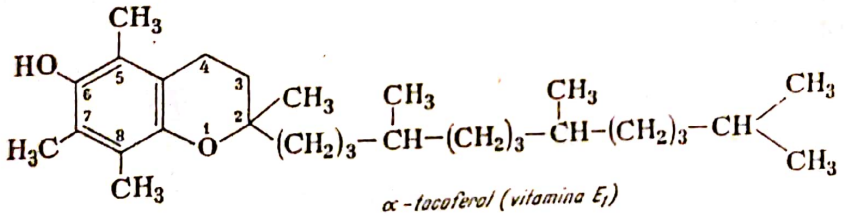
Alături de vitaminele D se obţin şi produşi secundari, izomeri ai acestora, numiţi *lumisteroli* şi *tahisteroli*.

Vitamina D_3 se obţine din *dehidrocolesterol*, care se formează la rîndul său din colesterol, prin dehidrogenare în poziţia **7, 8**, în prezenţa unei dehidrogenaze NAD^+ —dependente. Pe această cale este posibilă sinteza de către organismul animal a unei părţi din vitamina D necesară. Se explică astfel efectul binefăcător al radiaţiilor ultraviolete în prevenirea şi combaterea rahitismului, principala afecţiune cauzată de lipsa vitaminei D. Ea se caracterizează prin modificarea raportului normal Ca : P.

În stare liberă, cantităţi mari de vitamine D se găsesc în untura de peşte.

4.1.3. VITAMINELE E (TOCOFEROLII)

Din punct de vedere chimic, vitaminele E sînt derivaţi obţinuţi prin grefarea unor substituenţi pe nucleul heterociclic numit croman. La patru din cele opt vitamine E cunoscute, unul din substituenţii din poziţia 2 este derivat de la alcoolul numit fitol. Vitaminele E care au acest radical se numesc *tocoferoli*.

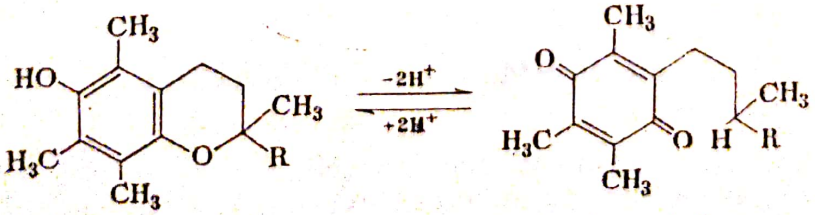


α-tocoferol (vitamina E_1)

β-, γ- şi δ-tocoferolii se obţin teoretic din α-tocoferol, prin îndepărtarea succesivă a radicalilor metil de pe nucleul benzenic.

Vitaminele E se numesc şi vitaminele antisterilităţii, deoarece lipsa lor din hrana şobolanilor produce la masculi sterilitate ireversibilă, iar la femele întîrzierea dezvoltării embrionului şi avortul. Mecanismele prin care vitaminele E intervin în reglarea acestor procese sînt puţin cunoscute.

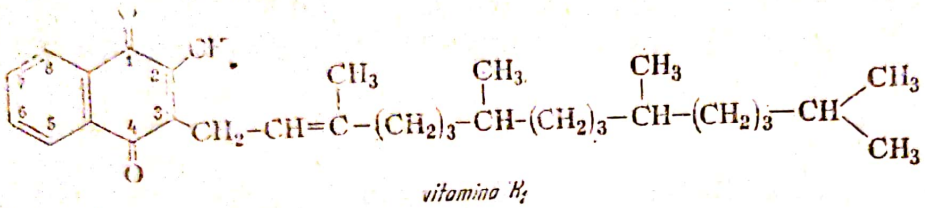
În schimb, efectul antioxidant al vitaminelor E, manifestat prin protejarea lipidelor contra formării de peroxizi, care apoi dau naştere la aldehide şi cetone (rîncezirea), este binecunoscut. În prezenţa agenţilor oxidanţi vitaminele E trec într-o formă chinonică :



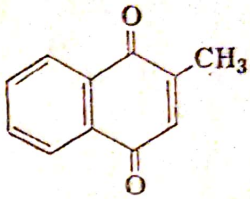
forma redusă *forma oxidată*

Pentru a putea funcţiona ca sisteme oxidoreducătoare, vitaminele E trebuie să aibă în mod obligatoriu gruparea hidroxil din poziţia **6**.

Toate vitaminele K au comun ciclul de 2-metilnaftochinonă. Ele se diferențiază prin radicalul R din poziția 3. Astfel, vitamina K_1 are un radical conținînd 20 de atomi de carbon, numit fitil, vitamina K_2 are $R = -C_{20}H_{39}$, în timp ce vitamina K_3 are $R = -H$, iar vitamina K_4 are $-OH$:



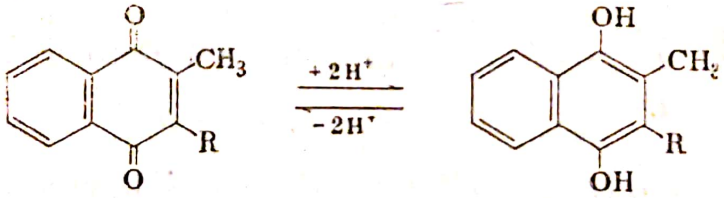
vitamina K_1



vitamina K_3 (menadiona)

Rezultă că radicalul din poziția 3 nu are importanță deosebită pentru activitatea vitaminică; radicalul determină în schimb solubilitatea vitaminelor K. Astfel vitaminele K_1 și K_2 sînt liposolubile, în timp ce K_3 și K_4 sînt hidrosolubile, ultimele prezentînd avantajul de a fi absorbite mai ușor.

Vitaminele K au proprietăți oxidoreducătoare; avînd un potențial redox de 0,05 V, după unii autori intervin în lanțul respirator înaintea citocromilor:



forma oxidată

forma redusă

Acest rol este îndeplinit în mod cert de către un alt compus de tip chinonic numit *ubichinonă* (v. „Lanțul respirator")

Proprietățile oxidoreducătoare ale vitaminelor K par a fi importante și pentru acțiunea specifică a acestora, aceea de a fi antihemoragice. Ele intervin în procesul de sinteză a protrombinei la nivelul ficatului. Carența în vitamina K se manifestă prin creșterea timpului de coagulare a sîngelui, ceea ce duce la hemoragii spontane.

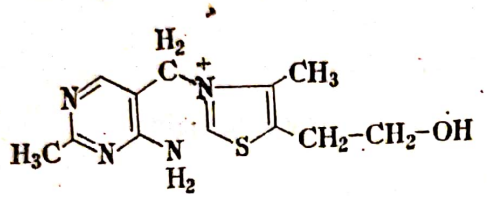
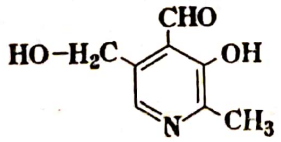
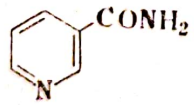
4.2. VITAMINELE HIDROSOLUBILE

Aproape toate vitaminele hidrosolubile fac parte din complexul B: B_1, B_2, B_6, B_{12}, nicotinamida, acidul pantotenic, biotina, acidul folic și PAB. Vitaminele C și P sînt considerate separat.

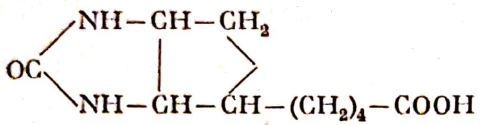
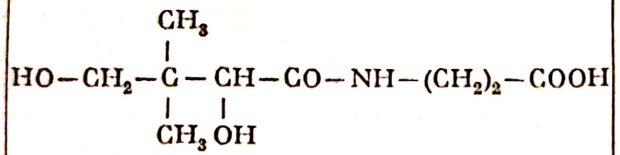
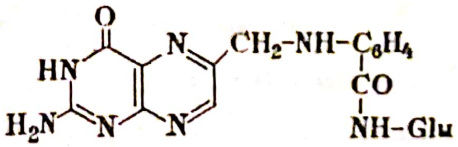
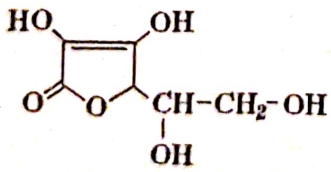
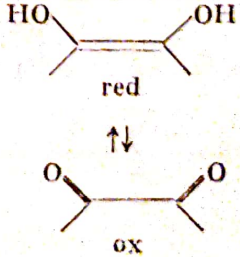
Descoperirea acestor vitamine este legată indisolubil de observațiile făcute la sfîrșitul secolului trecut și începutul secolului nostru că o serie de boli deosebit de grave se datorează unei alimentații insuficient de variate.

TABELUL 9

Structura şi unele proprietăţi ale vitaminelor hidrosolubile

Nr. crt.	Vitamina	Structura	Sistemul enzimatic	Reacţia catalizată
1	B_1 (tiamină, aneurină)		— Carbonicanhidrază — Piruvatliază — Cetoglutaratliază	$CO_2 + H_2O \rightleftarrows H_2CO_3$ $C_3O_3H_4 \rightarrow CO_2 + C_2OH_4$
2	B_2 (riboflavină)		— Flavoproteine FMN şi FAD — Dehidrogenaze — Glucozxidază	$FAD + H_2S \rightleftarrows FADH_2 + S$
3	B_6 (piridoxal)		— Aminoacid-decarboxilaze — Transaminaze	$R-CH(NH_2)-COOH \rightarrow R-CH_2-NH_2 + CO_2$
4	PP (nicotinamidă)		— Oxidoreductaze NAD^+ şi $NADP^+$ — Alcooloxidază	$H_2S + NAD^+ \rightleftarrows S + NADH + H^+$

TABELUL 9 (continuare)

5	Biotină		— Ligază pt. fixarea CO_2	$B-CO_2 + A \rightarrow A-CO_2 + B$
6	Acid pantotenic		— Transferaze — Activarea şi transportul acetatului (CoA-SH)	$CH_3-CO-SCoA \rightleftarrows CH_3-CO \sim + CoA-SH$
7	Acid folic		— Transferaze pt. un atom de carbon activ	$THFA + C_1 \rightleftarrows THFA-C_1$
8	B_{12} (cianocobalamină)	$C_{63}H_{83}N_{14}O_{14}C_0P$	— Transferază pt. metil — ADN-reductază	$B_{12} + -CH_3 \rightleftarrows B_{12}-CH_3$
9	C (acid ascorbic)		— Sistem redox probabil şi enzimatic	

Scanned with OKEN Scanner

Astfel vitamina B_1, prima vitamină cunoscută, a fost izolată din tărițele de orez a căror îndepărtare (utilizarea orezului decorticat) produce boala beri-beri ; în mod similar a fost izolată vitamina C în legătură cu boala numită scorbut, vitamina PP în legătură cu pelagra etc. De aici derivă și numele, destul de utilizat, de vitamină antiberi-beri, vitamină antiscorbutică, vitamină antipelagroasă etc.

În prezent nu numai că s-a determinat structura tuturor vitaminelor hidrosolubile cunoscute (după cum s-a văzut și a celor liposolubile), dar ele se și sintetizează pe cale chimică, denumirea adoptată fiind derivată din structură.

Grație progreselor remarcabile ale biochimiei în ultimii ani, azi se cunosc și mecanismele intime ale proceselor în care vitaminele hidrosolubile sînt implicate. Astfel, vitaminele complexului B constituie coenzimele (gruparea prostetică) unor enzime ce catalizează reacții fundamentale în cadrul metabolismului intermediar. Vitamina din structura enzimei determină tipul de reacție, în timp ce proteina determină specificitatea de substrat. De exemplu, vitamina B_6 intră în structura enzimelor de tansaminare (transaminaze, aminotransferaze) și în structura decarboxilazelor unor aminoacizi.

Avînd în vedere rolul de coenzime al vitaminelor hidrosolubile, care va fi descris pe larg în capitolul următor, în tabelul 9 se dau numai structurile vitaminelor hidrosolubile, sistemul enzimatic din care face parte fiecare și reacția catalizată.

Scanned with OKEN Scanner

5 ENZIMELE

Enzimele sînt substanţe chimice complexe de natură organică (proteine coloidosolubile), elaborate pe plante, animale şi microorganisme, capabile să influenţeze viteza reacţiilor biochimice. Denumirea de *enzime* a fost dată de către K ü h n e (1878), care a studiat acţiunea drojdiei asupra fermentaţiei.

În 1838, P a y e n şi P e r s o z au observat că extractul de malţ precipitat cu alcool conţine o substanţă termosolubilă capabilă să transforme amidonul în zahăr. Această substanţă a fost numită pînă în 1878 diastază, în timp ce în lucrările lui L i e b i g se găseşte denumirea de *ferment*, denumire pe care a folosit-o şi P a s t e u r şi care persistă şi azi în unele lucrări.

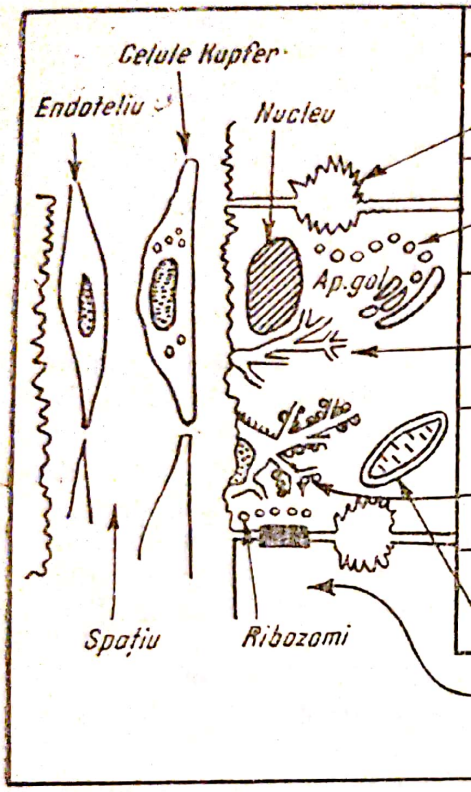
E. F i s c h e r a arătat legătura dintre enzimă şi substrat şi intercondiţionarea celor doi factori. Seria descoperirilor unor noi enzime şi purificarea lor a început în 1920, prin lucrările lui W i l l s t ä t t e r şi colab. care au reuşit să obţină preparate enzimatice aproape pure. În 1926, S u m n e r a obţinut pentru prima dată o enzimă în stare cristalină : ureaza din făină de soia. În 1929, N o r t h r o p a cristalizat pepsina din sucul gastric.

Paralel cu lucrările de separare şi cristalizare a enzimelor, se dezvoltă şi studiile asupra proprietăţilor acestor substanţe noi, privind factorii care influenţează activitatea lor în sens pozitiv sau negativ. Se cercetează repartizarea enzimelor în organism în general, cît şi repartiţia lor în edificiul extracelular şi intracelular, cu scopul de a explica şi elucida complexitatea reacţiilor care au loc în cadrul metabolismului intermediar. Prin implicaţiile largi pe care le au enzimele, prin metodologia complexă de investigare a lor, se depăşeşte cadrul strict al biochimiei, numeroase alte ştiinţe contribuind la dezvoltarea permanentă a acestui domeniu.

Determinarea concentraţiei diferitelor enzime în lichidele biologice sau în structurile intracelulare poate da o imagine destul de fidelă asupra metabolismului diferitelor organe şi ţesuturi. Fiecare ţesut şi organ conţine unele sisteme enzimatice specifice care îl diferenţiază de alte ţesuturi şi organe ; în acelaşi timp în celulele tuturor ţesuturilor şi organelor există

Scanned with OKEN Scanner

toate, sau aproape toate, enzimele principalelor metabolisme. De exemplu, principalele tipuri de enzime întîlnite în formaţiunile subcelulare ale celulelor hepatice sînt trecute în figura 22.



STRUCTURA	FUNCŢIA	ENZIMELE
Capilare biliare	Acizi biliari	Fosfotază alcalină Leucinaminopeptidază Nucleotidaze
Lizozomi	Hidroliză intracelulară, enzime lizozomale	Enzime hidrolitice pH 3-5
Reticul endoplasmic	Enzime de conjugare acetilări, metilări, oxidoreduceri	Glucozo-6-fosfatază Citocromi Ligaze
Ribozomi	Proteinosinteză	Albumină Colinesterază Ceruloplasmină Factori de coagulare
Mitocondrie	Reacţii generale (bioenergetică)	GlDH, GOT, MDH_m
Citoplasmă	–	Enzime indicatoare (GOT, GPT, LDH, Ald, SDH, MDH_s)

Fig. 22. Cele mai importante enzime hepatice şi localizarea lor în formaţiunile subcelulare.

Numărul total al enzimelor din diverse celule nu este cunoscut; în orice caz el este foarte mare. Pentru exemplificare, în tabelul 10 se menţionează cîteva din sistemele enzimatice ale celulei hepatice.

TABELUL 10

Sisteme enzimatice din celula hepatică

Sistemul enzimatic	Numărul de enzime
Sinteza de glicogen	5
Sinteza de galactoză	6
Oxidarea fosfogluconatului	11
Glicoliza	11
Ciclul Krebs	17
Sinteza de lecitină	8
Degradarea acizilor graşi	5
Oxidarea fenilalaninei	8
Metabolismul metioninei şi cistinei	10
Biosinteza ureei	10
Sinteza CoA	6
Sinteza hemului	9
Sinteza pirimidinelor	6
Sinteza purinelor	14

Scanned with OKEN Scanner

Enzimele dau cele mai reale informaţii privind starea funcţională a biosistemelor. Determinarea activităţii lor, în condiţii pe cît posibil identice celor din organism (temperatură, *p*H etc.) este metoda cea mai ştiinţifică de apreciere a stării normale sau patologice a ţesuturilor sau organelor. Determinarea activităţilor enzimatice constituie astfel cel mai important auxiliar în stabilirea diagnosticului diferenţial şi pozitiv al diferitelor boli. În acelaşi timp determinările enzimatice sînt utile în urmărirea evoluţiei bolii, a eficacităţii terapiei etc.

5.1. STRUCTURA ENZIMELOR

Cunoaşterea structurii chimice a enzimelor a fost posibilă numai odată cu dezvoltarea, în primele decenii ale secolului nostru, a tehnicilor utilizate de chimia organică. Una din metodele vechi care a contribuit la purificarea şi separarea enzimelor a fost cea a lui Willstätter, de absorbţie şi eluţie pe caolin şi oxid de aluminiu. Odată cu purificarea şi cristalizarea enzimelor s-a confirmat caracterul coloidal, macromolecular al acestor substanţe, precum şi natura lor proteică. Toate enzimele descoperite şi purificate pînă azi s-au dovedit a fi proteine conjugate cu o grupare prostetică, ce poate fi vitamină, hormon sau ion metalic.

Structura unei enzime poate fi schematizată în felul următor :

$$\text{enzimă} = \text{proteină} + \text{grupare prostetică}$$

sau, după formularea lui Euler :

$$\text{holoenzimă} = \text{apoenzimă} + \text{coenzimă}$$

Rolul părţii proteice este de a imprima specificitatea de substrat, iar al grupării prostetice de a determina tipul şi viteza de reacţie.

Specificitatea de substrat a unei enzime care determină desfacerea unei substanţe A—B în două componente C şi D depinde de trei factori :

— natura legăturii dintre cele două componente, deci o enzimă cu specificitate largă (de exemplu, esterazele, proteazele) ;

— legătura dintre cele două componente şi structura moleculară a uneia dintre componente, în care caz enzima prezintă o specificitate de grup (de exemplu, α-*D*-fructozidaza) şi structura moleculară a ambelor componente, în care caz specificitatea este absolută. Dintre enzimele cu specificitate absolută se pot aminti următoarele : ureaza, arginaza, glucozidaza, aminoaciddecarboxilaza etc. ;

— structura sterică a substratului este în multe cazuri factorul determinant al specificităţii : se vorbeşte în acest caz de o specificitate stereochimică. Constituenţii materiei vii sînt în general substanţe optic active, ori s-a constatat că dintr-o pereche de enantiomeri numai unul suferă reacţia catalizată de enzimă, specificitatea stereochimică fiind absolută.

Coenzima determină natura reacţiei pe care o suferă substratul combinat în prealabil cu apoenzima. Mecanismul intim al unor procese enzimatice, cum ar fi transportul de electroni, transportul de hidrogen, de grupări $-NH_2$, $-CH_3$, CO_2, acetil etc. este imprimat de gruparea prostetică.

Scanned with OKEN Scanner

Între enzimă și substrat se realizează legături — de natură diferită — la care participă și partea proteică și cea prostetică, prin grupările lor active. Grupările chimice active, prin care enzima se leagă de substrat, sînt localizate în regiuni reduse față de suprafața enzimei și poartă numele de centri activi. Teoria dublei afinități, conform căreia într-o enzimă ar exista doi centri activi, unul determinat de componenta proteică, iar al doilea de partea prostetică, explică pînă în prezent, în mod acceptabil, unele mecanisme de reacție ale enzimelor.

Pentru a explica specificitatea stereochimică, Bergman și Fruton admit că în centrul activ al unei enzime trebuie să existe cel puțin trei grupări chimice distincte. Asemenea grupări pot fi —SH, —OH, $-NH_2$, —COOH, ionii metalici sau alte grupări funcționale din catena laterală a lanțurilor polipeptidice din apoenzimă. Cele trei grupări ale centrului activ ar corespunde cu trei din cei patru substituenți ai unui atom de carbon, asigurînd, astfel, specificitatea stereochimică.

Problema naturii legăturii enzimă-substrat, realizată prin intermediul centrilor activi, este departe de a fi complet elucidată. De exemplu printre altele s-a studiat structura centrului activ al acetil-CoA-carboxilazei. S-a constatat că în centrul activ sînt două grupări active, separate în spațiu :

— o grupare ionică formată din ionul Mn^{2+} la care substratul se leagă electrostatic și prin forțe van der Waals;

— o zonă activă, comună multor carboxilaze, care formează cu gruparea carboxilică o legătură covalentă ; restul imidazolic pare să aibă un rol în fixarea bioxidului de carbon, inducînd un caracter electrofil viitoarei grupări carboxilice (fig. 23).

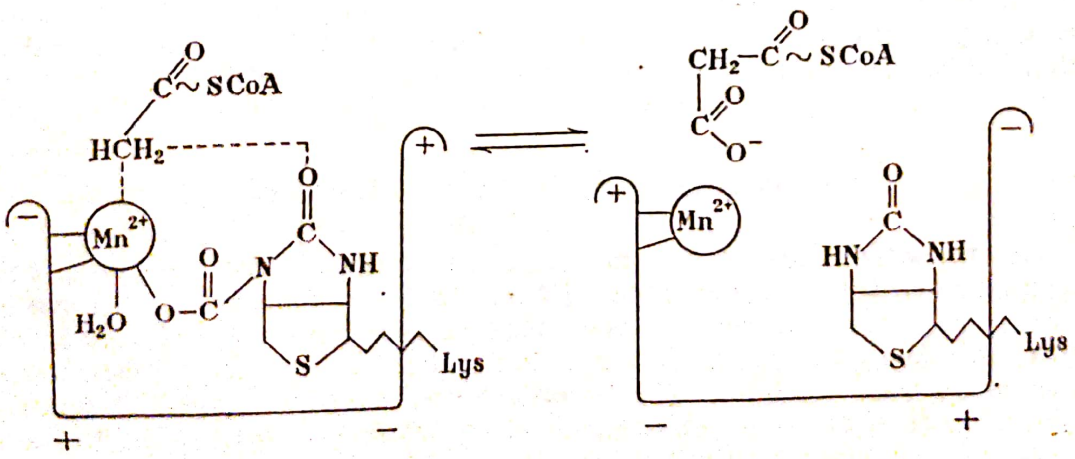


Fig. 23. Legarea substrat-enzimă (complexul substrat-enzimă pentru acetil-CoA-carboxilază).

Prin astfel de legături se pregătește reacția următoare sau se leagă două substraturi, între care ulterior va avea loc o reacție.

Scanned with OKEN Scanner

5.2. NOȚIUNI DE CINETICĂ ENZIMATICĂ

Studiul cinetic al activității enzimatice se bazează pe măsurarea cantitativă a vitezei de desfășurare a reacției catalizate.

Reacțiile chimice care au loc în organismele vii se desfășoară la temperatură constantă, în cazul organismului uman la 37°C. Considerăm una din miile de reacții catalizate, de exemplu formarea acidului citric din acidul oxalacetic și acetil-coenzima A — reacția de inițiere a ciclului K r e b s — catalizată de citratsintetază (enzima de condensare). Această reacție poate avea loc și în lipsa enzimei, dar cu un randament foarte redus ; la temperatura de 37°C numai un număr mic din moleculele de acid oxalacetic și acetil-CoA au energie suficientă pentru a reacționa. În absența catalizatorului ar trebui deci să ridicăm temperatura pentru a face ca toate moleculele, a căror imensă majoritate au energia medie E_r, să fie aduse la nivelul maxim al energiei (fig. 24). Energia astfel furnizată poartă numele de energie de activare. Enzima care catalizează această reacție determină, din punct de vedere energetic, o scădere însemnată a energiei de activare, reacția putîndu-se desfășura cu randament bun la temperatura de 37°C.

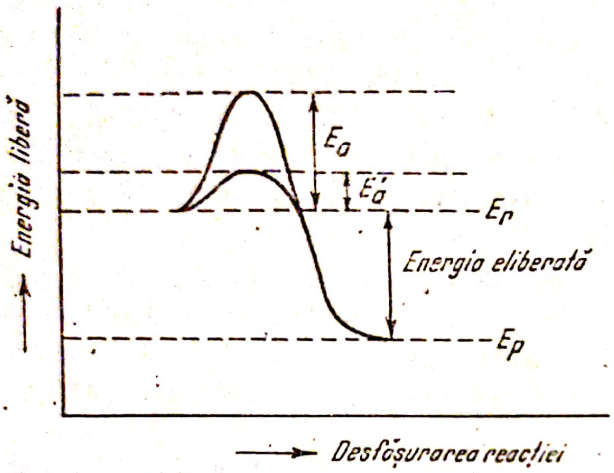


Fig. 24. Energetica reacțiilor biochimice. E_r — energia medie a reactanților ; E_p — energia medie a produselor de reacție ; E_a — energia de activare fără catalizator ; E_a' — energia de activare cu catalizator.

Dintre numeroșii factori care influențează viteza unei reacții enzimatice cei mai importanți sînt următorii : concentrația substratului, concentrația enzimei, *p*H-ul, temperatura, activatorii și inhibitorii, însușirile alosterice ale enzimelor, timpul de relaxare și alții.

5.2.1. INFLUENȚA CONCENTRAȚIEI SUBSTRATULUI

Dintre factorii care determină viteza unei reacții enzimatice, concentrația substratului are o deosebită importanță. Aspectele cantitative ale dependenței vitezei de reacție de concentrația substratului sînt redate de teoria lui M i c h a e l i s - M e n t e n (1913), dezvoltată ulterior de L i n e w e a v e r - B u r k și alți cercetători. Această teorie se bazează pe ipoteza, confirmată experimental, că între enzimă și substrat se formează un complex activat enzimă-substrat, prin a cărui scindare se pun în libertate produșii de reacție și enzima, ultima fiind capabilă să se combine cu altă moleculă de substrat :

$$E + S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \longrightarrow E + P$$

Reacţia de formare a complexului enzimă-substrat este reversibilă, constantele de echilibru fiind k_1 şi k_2. Ţinînd seama de faptul că viteza oricărei reacţii chimice este proporţională cu concentraţiile reactanţilor, se poate scrie :

$$V_1 = k_1([E] - [ES]) \cdot [S]$$

$$V_2 = k_2 \ [ES]$$

unde prin [E] s-a notat concentraţia enzimei, prin [S] concentraţia substratului, iar prin [ES] concentraţia complexului enzimă-substrat.

La echilibru $V_1 = V_2$, deci :

$$k_1([E] - [ES]) \cdot [S] = k_2[ES],$$

de unde

$$\frac{([E] - [ES] \cdot [S]}{[ES]} = \frac{k_2}{k_1} = K_M$$

K_M poartă numele de constanta Michaelis şi este de fapt constanta de disociere a complexului enzimă-substrat şi o măsură a afinităţii dintre enzimă şi substrat.

Deoarece determinarea concentraţiei complexului enzimă-substrat este deseori anevoioasă, calcularea constantei Michaelis pe baza relaţiei de mai sus ar fi şi ea dificilă. De aceea, expresia menţionată a fost dezvoltată. Se determină valoarea lui [ES]:

$$[ES] \cdot K_M = [E] \cdot [S] - [ES] \cdot [S]$$

$$[ES](K_M + [S]) = [E] \cdot [S]$$

$$[ES] = \frac{[E] \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

Complexul enzimă-substrat se scindează în produşi de reacţie şi enzimă liberă, această reacţie fiind în principiu reversibilă. Echilibrul ei este puternic deplasat în sensul de formare a produşilor finali, încît se poate scrie :

$$[ES] \xrightarrow{k_3} [E] + P \text{ unde } V = k_3 \cdot [ES]$$

Reacţiile enzimatice se desfăşoară în prezenţa unui exces de substrat, cînd practic întreaga cantitate de enzimă din sistem va fi transformată în complex enzimă-substrat. În acest caz viteza reacţiei enzimatice va fi viteza maximă în condiţiile date, deci :

$$V_{max} = k_3 \cdot [ES]$$

Întrucît concentraţia complexului enzimă-substrat este egală cu concentraţia totală a enzimei se poate scrie :

$$V_{max} = k_3[E]$$

Scanned with OKEN Scanner

Din relaţia $V = k_3 \cdot [ES]$ se poate scoate valoarea lui [ES]:

$$[ES] = \frac{V}{k_3}$$

atunci:

$$\frac{V}{k_3} = \frac{[E] \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

sau:

$$V = \frac{k_3 [E] \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

cum însă:

$$k_3 \cdot [E] = V_{max}$$

se poate scrie:

$$V = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

Aceasta este ecuaţia Michaelis-Menten şi permite calculul constantei Michaelis în funcţie de concentraţia substratului. Dacă în ecuaţia de mai sus se înlocuieşte valoarea lui V prin:

$$V = \frac{V_{max}}{2}$$

atunci:

$$\frac{V_{max}}{2} = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

sau

$$K_M + [S] = 2[S]$$

deci

$$K_M = [S]$$

Prin urmare, constanta Michaelis are valoarea numerică a concentraţiei substratului pentru care viteza de reacţie este jumătate din viteza maximă.

Dacă se reprezintă grafic viteza de reacţie în funcţie de concentraţia substratului, se ajunge la o curbă hiperbolică de forma următoare (fig. 25,*a*).

Constantele Michaelis variază în general, pentru diferite enzime, în limite cuprinse între 10^{-2} şi 10^{-5} mol/litru.

Lineweaver şi Burk au propus, pentru simplificare, să se utilizeze forma reciprocă a ecuaţiei Michaelis-Menten:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M + [S]}{V_{max} \cdot [S]}$$

Scanned with OKEN Scanner

sau

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Se observă că s-a ajuns la o nouă ecuaţie de forma :

$$y = ax + b$$

a cărei reprezentare grafică (fig. 25, *b*) este o dreaptă care nu trece prin origine şi ale cărei coordonate la origine sînt :

$$y = \frac{1}{V_{max}}; \quad x = -\frac{1}{K_M}$$

Pe baza ecuaţiei L i n e w e a v e r - B u r k determinarea constantei M i c h a e l i s este mult uşurată, fapt deosebit de important, dat fiind

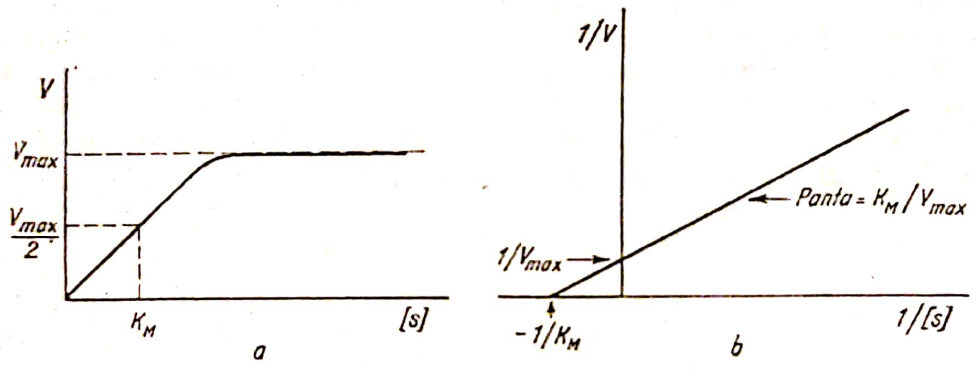


Fig. 25. Influenţa concentraţiei substratului asupra vitezei de reacţie : ecuaţia Michaelis – Menten (a) şi ecuaţia Lineweaver – Burk (b).

că această constantă caracterizează o enzimă *in vitro* cu aceeaşi precizie cu care constantele fizice caracterizează substanţele minerale sau organice.

Dacă în timpul catalizei se formează combinaţii cu alte sisteme enzimatice, atunci aprecierea constantei de viteză este mai dificilă. Se presupune o reacţie în care pot interfera două sisteme enzimatice de forma :

$$E + A \rightleftharpoons EA \qquad \text{şi}$$

$$E + B \rightleftharpoons EB \qquad \text{în care}$$

$$EA + B \rightleftharpoons EAB \qquad \text{sau}$$

$$EB + A \rightleftharpoons EAB$$

În acest caz, în fiecare sistem intervin : constanta proprie de viteză, gradul de disociere a compuşilor, acţiunea factorilor de mediu, activatorii şi inhibitorii, care vor contribui la stabilirea echilibrului dinamic al reacţiei.

Scanned with OKEN Scanner

Studiind numai specificitatea de grup, se constată că o enzimă se combină preferenţial cu anumite grupări active din substrat, pe cită vreme cealaltă se poate combina cu alte grupări, în care substratul poate fi mai activ sau mai puţin activ. În acest caz, viteza de reacţie după saturarea cu un substrat, în loc să fie constantă va începe să scadă. Acest lucru arată în ce mod concentraţiile mari de substrat devin un factor inhibitor pentru desfăşurarea reacţiei catalizate.

Cum s-a mai arătat, constanta Michaelis, ecuaţia Michaelis-Menten şi ecuaţia Lineweaver — Burk caracterizează reacţiile enzimatice care au loc *in vitro*. În celule, în cele mai multe cazuri, situaţia este mai complexă. Din punct de vedere termodinamic, organismele vii inclusiv celulele, sînt sisteme deschise. Într-un asemenea sistem echilibrul care se păstrează este acela al sumei masei şi energiei intrate şi suma celor ieşite (*stare staţionară, steady state*). Reacţiile particulare catalizate de enzime specifice nu mai respectă în totalitate condiţiile de echilibru menţionate pentru starea *in vitro*. Făcînd de obicei parte dintr-un lanţ de reacţii (cum ar fi glicoliza, degradarea acizilor graşi etc.), produsul de reacţie rezultat prin acţiunea unei enzime constituie substrat pentru enzima care catalizează reacţia următoare. Aceasta constituie de fapt o îndepărtare a produsului de reacţie care se traduce prin modificarea constantei de echilibru. Situaţia poate fi comparată într-un fel cu a unei reacţii de esterificare. Cît timp esterul format nu se îndepărtează, se ajunge la un echilibru caracterizat de o anumită constantă. Îndepărtînd esterul prin distilare (sau apa), echilibrul se deplasează, ajungîndu-se la transformarea completă a alcoolului şi acidului în ester.

5.2.2. INFLUENŢA CONCENTRAŢIEI ENZIMEI

În cursul unei reacţii enzimatice, moleculele de enzimă acţionează în soluţie aproximativ independent, transformînd moleculele substratului. Viteza de reacţie va fi deci proporţională cu concentraţia enzimei :

$$V = k[E]$$

De cele mai multe ori, activitatea enzimei este proporţională cu concentraţia sa, pînă la o anumită limită, după care nu se mai păstrează riguros relaţia dintre concentraţie şi activitate. Concentraţia sistemelor enzimatice diferă de la ţesut la ţesut, în funcţie de rolul pe care îl îndeplinesc în energetica organismului ; astfel, aldolaza din muşchii scheletici de iepure se găseşte în concentraţie de $4{,}5 \cdot 10^{-5}$ mol/kg ţesut, faţă de citratsintetază a cărei concentraţie este de $1{,}2 \cdot 10^{-5}$ mol/kg ţesut. Sînt unele enzime la care s-a studiat timpul de înjumătăţire, parametru care reflectă mai fidel dinamica metabolismului intermediar.

Tabelul 11 redă valorile timpului de înjumătăţire al unor enzime din serul de om. Prin timp de înjumătăţire al unei enzime se înţelege timpul în care jumătate din cantitatea enzimei se reînnoieşte prin sinteză.

Scanned with OKEN Scanner

La concentraţii enzimatice mari efectul catalitic nu este totdeauna proporţional cu concentraţia enzimei. Această comportare se încadrează în legea acţiunii maselor, care admite deplasarea echilibrului în sens invers în

TABELUL 11

Timpul de înjumătăţire al unor enzime.

Enzima	t/2
Ornitindecarboxilaza	11 minute
δ-aminolevulinicsintetaza	10 ,,
Tirozinaminotransferaza	90 ,,
Triptofanoxigenaza	120 ,,
Alaninaminotransferaza	24 ore
Catalaza	36 ,,
Glucokinaza	36 ,,
LDH	50 ,,
GOT	50 ,,
GPT	75 ,,
Citocrom-*c*-reductaza	80 ,,
Citocrom	100 ,,

cazul concentraţiei mari a unui partener de reacţie. Situaţia se întîlneşte mai ales cînd produşii de reacţie rămîn în interiorul sistemului, iar concentrarea lor peste o anumită limită produce o inhibare a vitezei de reacţie. Marea majoritate a reacţiilor catalizate respectă proporţionalitatea dintre concentraţia catalizatorului şi viteza de reacţie, dacă, bineînţeles, nu intervin în sistemul de reacţie activatori sau inhibitori de altă natură decît partenerii de reacţie.

Cele mai multe enzime, posibil toate, conţin în centrul lor activ sau în structura lor ioni metalici care intervin în reacţiile pe care le catalizează, de exemplu : Zn^{2+} sau Co^{2+} în anhidrazele carbonice şi carboxipeptidaze, Mg^{2+} sau Mn^{2+} în enolaze, kinaze, izomeraze, dehidrogenaze etc. Alte enzime reclamă prezenţa ionilor monovalenţi cum sînt Na^+, K^+ ori NH_4^+, pentru stabilizarea conformaţiei lor spaţiale, responsabilă de activitatea catalitică optimă.

Relaţiile dintre enzimă, ion metalic şi substrat se exprimă astfel :

$$E + M \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} EM,$$

care prin combinare cu substratul dau următoarea ecuaţie :

$$S + EM \underset{k_4}{\overset{k_3}{\rightleftharpoons}} SEM \underset{k_6}{\overset{k_5}{\rightleftharpoons}} PEM \underset{k_8}{\overset{k_7}{\rightleftharpoons}} EM + P$$

Între ionul metalic şi complexul format cu gruparea prostetică sau proteina din structura enzimei se creează o interacţiune, datorită participării la legătură a electronilor π, care conferă complexului o reactivitate crescută Formarea complexului intermediar SEM este o etapă obligatorie în procesul

Scanned with OKEN Scanner

catalitic, putîndu-se imagina diferite mecanisme de reacţie, unul de formă generală fiind următorul :

$$S + E + M \rightleftharpoons \begin{matrix} ES \\ EM \\ MS \end{matrix} \rightleftharpoons EMS \rightarrow EM + P$$

Rolul ionilor metalici în activitatea sistemelor enzimatice este mult mai vast şi complex ; se va reveni cu alte aspecte în capitolele următoare.

5.2.3. EFECTUL p H-ului

Reacţiile enzimatice depind de concentraţia ionilor de hidrogen (H^+) din mediul de reacţie.

Efectul *p*H-ului asupra vitezei de reacţie poate fi explicat prin capacitatea de ionizare a grupărilor active din structura enzimei, respectiv a centrului activ din enzimă, precum şi a altor grupări care nu fac parte din centrul activ, dar care prin ionizare pot determina starea specifică, catalitic activă, a enzimei ; totodată *p*H-ul poate acţiona prin schimbarea ionizării substratului.

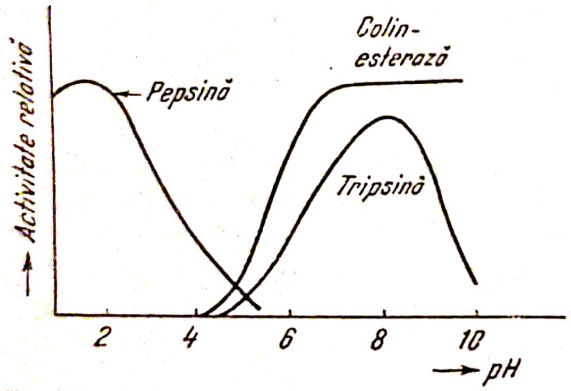


Fig. 26. Influenţa *p*H-ului asupra activităţii unor enzime.

Fiecare reacţie catalizată are un domeniu propriu de *p*H pentru o desfăşurare optimă, în cazul în care toţi ceilalţi parametri de care depinde activitatea enzimatică sînt constanţi, existînd o activitate maximă. Uneori activitatea enzimei nu se schimbă pe un interval larg de *p*H. Cîteva exemple sînt reprezentate în figura 26.

Posibilităţile de ionizare sînt numeroase atunci cînd se ionizează simultan şi enzima şi substratul, sau cînd enzima prezintă două grupări ionizabile.

În cele de mai sus s-a avut în vedere numai ionizarea ce are loc la variaţia *p*H-ului, considerîndu-se că ea este complet reversibilă. În realitate, mai ales cînd variaţia *p*H-ului este mai mare, se pot produce şi denaturări ireversibile a enzimei, caz în care readucerea *p*H-ului la valoarea optimă nu va mai fi însoţită de refacerea integrală a activităţii enzimei.

5.2.4. EFECTUL TEMPERATURII

Toate reacţiile chimice care au loc în organismul uman, catalizate sau necatalizate, se desfăşoară la temperatura constantă de 37°C. De aceea, *in vivo* temperatura nu produce variaţii ale vitezei reacţiilor ; creşteri

Scanned with OKEN Scanner

ale vitezei se obţin numai în stările febrile. Dacă însă se studiază *in vitro* reacţii enzimatice care în organism au loc la 37°C, se constată că scăderea temperaturii sub această valoare diminuează viteza de reacţie, în timp ce creşterea temperaturii măreşte viteza de reacţie. Explicaţia efectului temperaturii asupra vitezei reacţiilor enzimatice este uşor de dat dacă se ţine seama de energetica acestor reacţii prezentate în figura 24 : creşterea temperaturii peste 37°C determină o energie medie a reactanţilor mai mare şi pentru ca reacţia să aibă loc este nevoie de o energie de activare mai mică ; în cazul scăderii temperaturii energia medie scade şi ea şi deci energia de activare devine mai mare, reacţia fiind mai puţin probabilă.

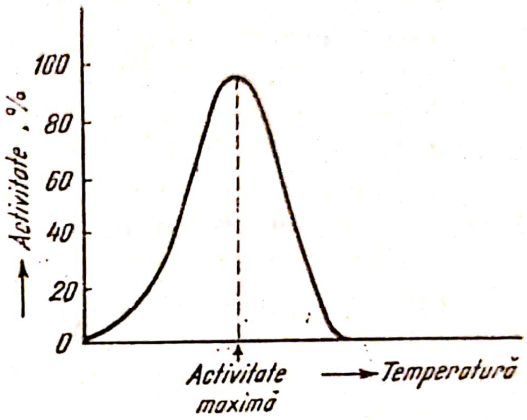


Fig. 27. Variaţia activităţilor enzimelor în funcţie de temperatură.

Creşterea temperaturii cu scopul de a mări viteza reacţiilor enzimatice sepoate face numai în anumite limite, dependente de enzimă. Peste o anumită valoare de temperatură enzima se denaturează, în general ireversibil, şi atunci viteza reacţiei enzimatice scade. Pentru fiecare reacţie catalizată există deci un optim de temperatură după cum reiese din figura 27.

Se obişnuieşte ca influenţa temperaturii asupra vitezei reacţiilor enzimatice să se exprime prin *coeficientul de temperatură* notat Q_{10} şi definit ca :

$$Q_{10} = \frac{\text{viteza de reacţie la } (T°+10°)}{\text{viteza de reacţie la } T°}$$

Coeficientul de temperatură exprimă deci creşterea vitezei de reacţie atunci cînd temperatura creşte cu 10°C, bineînţeles sub temperatura de denaturare. În cele mai multe cazuri $Q_{10} = 2$.

Temperaturile scăzute au un efect de conservare asupra enzimelor ; gelificarea corespunde unei denaturări reversibile. Prin revenire la temperatura optimă, enzima îşi recapătă activitatea iniţială, rareori îşi pierde parţial din activitate.

5.2.5. PREZENŢA ACTIVATORILOR ŞI INHIBITORILOR

Activitatea enzimelor, pe lîngă factorii arătaţi anterior, este influenţată şi de unele substanţe numite *efectori*. Aceştia pot acţiona în sens pozitiv, mărind viteza de reacţie şi se numesc activatori sau pot încetini viteza de reacţie şi sînt denumiţi inhibitori.

Unii activatori (vitaminele E, K şi C) acţionează asupra enzimelor prin protejarea faţă de anumiţi inhibitori, cum sînt peroxizii, deci au şi rol de protectori. Altă clasă de activatori acţionează prin deblocarea unei părţi proteice care masca partea activă din enzimă. În cazul pepsinei şi

Scanned with OKEN Scanner

tripsinei, de exemplu, se rupe un oligopeptid din molecula proteică sub acţiunea activatorului HCl, respectiv enterokinază. Ionii metalici, care funcţionează ca activatori, formează cu partea prostetică a enzimei combinaţii complexe, care favorizează ulterior combinarea cu substratul sau induc un efect electromer spre centrul enzimatic activ, efect care va înlesni ulterior reacţia electrofilă sau nucleofilă.

Inhibitorii scad activitatea unei enzime prin două mecanisme majore :

— se combină cu enzima şi o inactivează ;

— se combină cu substratul şi-l fac impropriu pentru transformare.

Studiul cinetic al fenomenului de inhibiţie permite să se deosebească două tipuri de inhibiţie : inhibiţia competitivă şi inhibiţia necompetitivă.

În inhibiţia competitivă, activitatea inhibitorului este influenţată de concentraţia substratului, în timp ce în inhibiţia necompetitivă este independentă de ea.

Inhibiţia competitivă este dată, în general, de substanţele cu o structură asemănătoare cu a substratului. În prezenţa inhibitorului, enzima este angajată în reacţii reversibile.

$$E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P \text{ sau } ES + I \rightleftharpoons EIS$$

$$E + I \rightleftharpoons EI;\ EI + S \rightleftharpoons EIS \rightarrow E + P + I$$

Se pot scrie constantele de disociere a complexelor enzimă-substrat şi enzimă-inhibitor :

$$K_M = \frac{[E] \cdot [S]}{[ES]};\quad K_I = \frac{[E] \cdot [I]}{[EI]}$$

Ambele reacţii fiind reversibile, iar substratul legîndu-se de acelaşi centru activ cu inhibitorul, o concentraţie mare de substrat va deplasa echilibrul în sensul formării complexului enzimă-substrat.

Inhibitorii competitivi nu modifică valoarea V_{max} din ecuaţia Michaelis-Menten, deoarece la orice concentraţie de inhibitor există o concentraţie a substratului atît de ridicată încît asigură activitatea integrală a enzimei. Aceasta permite uşoara recunoaştere a inhibitorilor competitivi prin studiul dreptelor obţinute reprezentînd $1/v$ în funcţie de $1/[S]$ în condiţiile în care în mediu se află şi inhibitor. Se remarcă creşterea pantei dreptei, cu atît mai mult cu cît concentraţia inhibitorului este mai mare, intersecţia cu ordonata, deci $1/V_{max}$, rămînînd nemodificată. Din intersecţia dreptei cu abscisa, se poate calcula valoarea lui K_I (fig. 28, *a*).

Un exemplu de inhibiţie competitivă îl constituie cazul reacţiei de dehidrogenare a acidului succinic la acid fumaric, catalizată de succinatdehidrogenază, reacţie de mare importanţă în cadrul ciclului Krebs. Acidul malic, diferind de acidul succinic numai prin existenţa unui hidroxil în locul unui hidrogen la una din grupările metilenice, poate să se lege de centrul activ al succinatdehidrogenazei. Fracţiunea de succinatdehidrogenază combinată cu acidul malic poate fi recuperată prin simpla creştere a concentraţiei substratului.

Scanned with OKEN Scanner

În inhibiția necompetitivă (fig. 28, *b*) substratul nu poate disloca inhibitorul din complexul enzimă-inhibitor. Din această cauză, viteza de reacție nu este influențată de concentrația substratului.

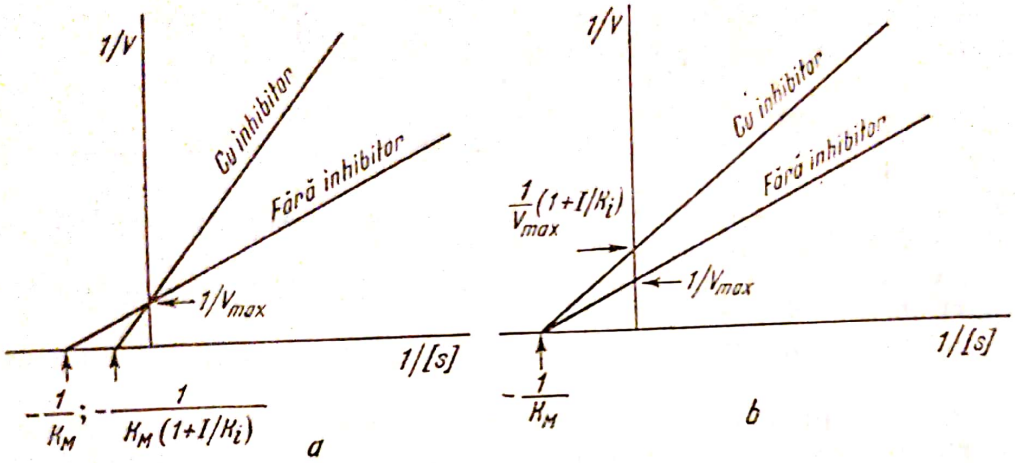


Fig. 28. Reprezentarea ecuației Lineweaver – Burk în condițiile prezenței unui inhibitor competitiv (*a*) și în prezența unui inhibitor necompetitiv (*b*).

Reacțiile generale care au loc în cazul inhibiției necompetitive sînt :

$$E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P$$

$$E + I \rightleftharpoons EI$$

și eventual :

$$ES + I \rightleftharpoons EIS$$

$$EI + S \rightleftharpoons EIS$$

În inhibiția necompetitivă, prin faptul că fracțiunea de enzimă care s-a combinat cu inhibitorul este pierdută pentru reacție, lucrurile se petrec ca și cum cantitatea de enzimă s-a micșorat cu cantitatea care s-a combinat cu inhibitorul.

Interpretarea matematică a inhibiției necompetitive, duce la o expresie de forma :

$$v = \frac{V_{max}[S]}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)(K_M + [S])}$$

unde I este concentrația inhibitorului, iar K_I constanta de disociere a complexului enzimă-inhibitor.

Relația de mai sus este asemănătoare cu relația Michaelis și arată că, în prezența unui inhibitor necompetitiv, viteza de transformare a substratului se micșorează cu factorul $1 + \frac{[I]}{K_I}$.

Dacă I = 0, relaţia devine identică ecuaţiei Michaelis-Menten.

Luînd valorile reciproce ale ecuaţiei de mai sus, se obţine ecuaţia Lineweaver-Burk, în cazul inhibiţiei necompetitive, care este de forma :

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{max}}\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)\frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)$$

Dacă se reprezintă grafic această ecuaţie, se obţin drepte cu aspectul din figura 28, *b*.

În cazul inhibiţiei necompetitive, viteza maximă a reacţiei variază, valoarea lui K_M menţinîndu-se constantă.

După mecanismul lor, inhibiţiile, fie competitive, fie necompetitive, se împart în mai multe categorii :

— inhibiţii prin substanţe care au o structură analoagă cu a substratului ;

— inhibiţii prin blocarea centrilor activi ai părţii proteice din molecula enzimei, cum este în cazul enzimelor sulfhidrilice, inactivate prin oxidanţi, metale grele, agenţi de alchilare, agenţi de chelatare ;

— inhibiţii prin substanţe care acţionează asupra substratului ;

— inhibiţii prin inhibitori specifici produşi de materia vie ;

— inhibiţii prin antienzime ;

— inhibiţii prin produşii de reacţie, fenomen important pentru autoreglarea proceselor metabolice, cît şi alte tipuri de inhibiţie, cum ar fi prin compuşi alosterici.

Rolul şi natura ionilor metalici în activarea sau inhibarea sistemelor enzimatice sînt sintetizate în tabelul 12.

TABELUL 12

Efectele ionilor metalici asupra activităţii unor enzime

Sistemul enzimatic	Ioni activatori	Ioni inhibitori
— Aldehiddehidrogenaza	K^+, NH_4^+ sau Rb^+	Na^+, Li^+ sau Cs^+
— Acetil-CoA-sintetaza	Mg^{2+}, sau Mn^{2+}	—
— ATP-aza	Mg^{2+} sau Mn^{2+}	Ca^{2+}
— Fosfataza alcalină	Mg^{2+}, Mn^{2+}, Cu^{2+}	Zn^{2+} sau Be^{2+}
— Gliceraldehidhidrogenaza	NH_4^+, K^+, Rb^+	Zn^{2+}
— Piruvatkinaza	Mg^{2+}, K^+, Rb^+	Na^+ sau Li^+
— Glutaminsintetaza	Mn^{2+}, Mg^{2+}	Ca^{2+}
— Riboflavinkinaza	Mg^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+}, Mn^{2+}	Ca^{2+}
— Pirofosfataza anorganică	Mg^{2+}	—
— Creatinkinaza	Mg^{2+}, Mn^{2+}, Ca^{2+}	Zn^{2+}
— Piruvatdecarboxilaza	Mg^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+}, Cd^{2+}	—
— Oxalacetatdecarboxilaza	Mn^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Mg^{2+}	—
	Ni^{2+}, Zn^{2+}, Fe^{2+}, Ca^{2+}	

5.2.6. ALOSTERIA ÎN CONTROLUL ACTIVITĂŢII ENZIMATICE

Una din cele mai remarcabile proprietăţi ale organismelor vii este autocoordonarea activităţii celulare, pentru menţinerea unui echilibru dinamic între produşii de catabolism şi procesele de biosinteză. Dintre

Scanned with OKEN Scanner

multiplele mecanisme care acționează în reglarea metabolismului intermediar celular, cel de inhibiție prin produșii finali de reacție poate să intervină în toate etapele de biosinteză a compușilor biologic activi. Experimental au fost evidențiate numeroase cazuri în care produșii finali ai unei căi de biosinteză inhibă activitatea enzimei care catalizează prima reacție, de exemplu: izoleucina inhibă treonindezaminaza, triptofanul inhibă antranilatsintetaza, CTP inhibă aspartattranscarbamilaza.

Inhibarea prin intermediul produsului final a primei reacții din șirul celor implicate în calea de biosinteză poartă numele de *retroinhibiție* sau *inhibiție prin feed-back*. Metabolitul inhibitor se numește *efector* sau *modulator*, iar enzima asupra căreia acționează se numește *enzimă reglatoare* sau *alosterică*.

În cazul șirului de reacții a unei căi oarecare de sinteză:

$$A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow D \begin{matrix} \nearrow E \\ \searrow F \end{matrix}$$

o supraproducție a lui E (sau F), va produce, prin mecanismul de *feed-back*, o diminuare a formării compușilor intermediari B, C, D și F. Pe această cale este controlată deci viteza tuturor reacțiilor căii metabolice.

Într-un caz mai general, acțiunea produșilor de metabolism se exercită asupra sistemelor enzimatice care catalizează și reglează diferite etape ale reacțiilor biochimice. Susceptibilitatea sistemelor enzimatice, tradusă prin activarea sau inhibarea lor de către alți metaboliți decît substratul, sau chiar de către substrat, este o caracteristică generală a acestor sisteme. Savanții francezi Jacob, Monod și Changeux (distinși cu premiul Nobel), prin lucrările lor, au arătat că activitatea catalitică a enzimelor poate fi influențată de substanțe cu molecule mici, optic active. De multe ori aceste substanțe nu au o similaritate structurală cu substratul, dar intervin în desfășurarea reacțiilor printr-un mecanism de modulare a activității enzimelor alosterice.

Enzimele reglatoare au structuri complexe, fiind alcătuite din mai multe lanțuri polipeptidice. Avînd structură cuaternară ca și hemoglobina, aceste enzime se pot asocia sau disocia în funcție de condițiile de mediu. Se pot stabili condiții pentru realizarea unui echilibru dinamic de tipul:

$$\text{protomeri} \rightleftharpoons \begin{matrix} \text{subunități} \\ \updownarrow \\ \text{oligomeri} \end{matrix}$$

Existența acestui echilibru face ca enzima să aibă mai multe posibilități de a se lega cu substratul. Enzimele reglatoare homotrope conțin două sau chiar mai multe poziții active, din care cel puțin una este catalitică. Substratul se constituie în acest caz și ca modulator, accelerînd reacția catalitică. În locul substratului pot acționa alți metaboliți care se fixează pe aceiași centri ca și substratul. Deși nu este o enzimă, hemoglobina constituie un model de acțiune a enzimelor homotrope (v. „Hemoglobina").

De multe ori efectul alosteric se datorește unor produși de reacție care nu au asemănare structurală cu substratul, influențînd totuși activitatea catalitică a sistemului. Acest mod de influențare, ca rezultat al inter-

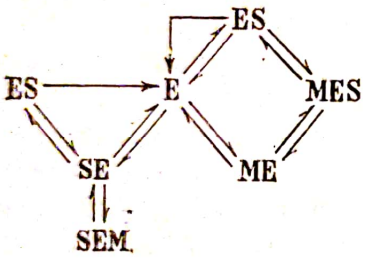
Scanned with OKEN Scanner

acțiunii cu metaboliți diferiți, se numește heterotrop. Se crede că enzimele heterotrope au centrii activi de care se fixează modulatorul, diferiți de cei ai substratului.

Mecanismul său de acțiune poate fi sinergic sau antagonist, deci să producă o activare sau o inhibare a reacției. Metabolitul poate să influențeze afinitatea dintre substrat și enzimă, viteza de transformare a substratului, sau pe amîndouă. Din punct de vedere cinetic, mecanismul heterotrop are un caracter parțial competitiv, mai ales la concentrații mai mari de substrat.

Se consideră că unele enzime reglatoare foarte complexe pot fi homotrop-heterotrope. La stadiul actual al cunoștințelor în acest domeniu este încă destul de greu de precizat exact pentru fiecare enzimă reglatoare apartenența la una din cele trei clase.

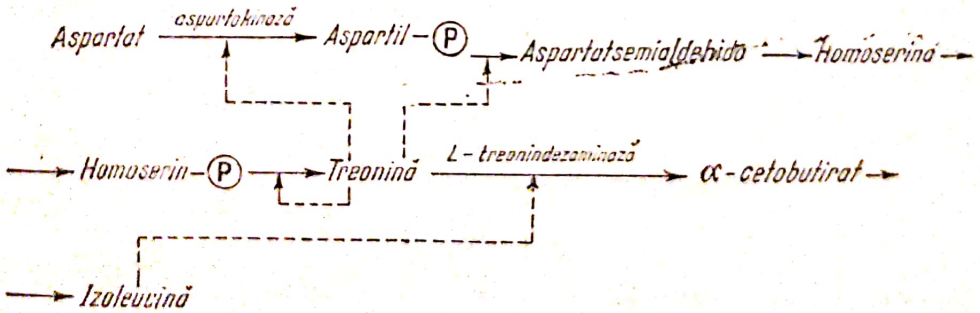
Dacă luăm în considerare aspectul cel mai simplu în care intervin în reacție substratul, enzima și alți factori, care pot fi molecule simple, ioni metalici sau forme stereoizomere, se poate schematiza un sistem de reacții de forma :



În aceste reacții, *M* poate interveni ca modulator, inhibitor sau activator al procesului.

Dacă *M* este similar ca structură cu *S* va intra în competiție cu acesta, și pentru a funcționa ca activator trebuie să fie în concentrație mai mică decît *S*. În cazul în care concentrația lui *M* este mult mai mare ca a lui *S*, se formează preponderent complexele *ME* și *SEM*, care vor inhiba deplasarea celeilalte căi de reacție.

Pentru exemplificare, se va urmări biosinteza treoninei și a izoleucinei în *E. coli*, unul din modelele cele mai simple pentru evidențierea mecanismului alosteric. Trecerea aspartatului în esterul fosforic corespunzător, prima reacție în biosinteza treoninei și leucinei, este catalizată de enzima aspartokinază :



S-a constatat că în sistem există trei aspartokinaze diferite, care sînt susceptibile de o reglare diferențială de inhibiție sau represie, în funcție de informațiile primite prin mecanismul de *feed-back* de la produșii de reacție. Una din aspartokinaze este inhibată specific de concentrații mari de lizină, care pot apărea în sistem prin trecerea aspartatsemialdehidei în dihidrodipicolinat și apoi în lizină. A doua aspartokinază este specific și complet inhibată de *L*-treonină, iar a treia, care se găsește în cantitate mai mică, este inhibată specific de homoserină.

Scanned with OKEN Scanner

Referitor la structura modulatorilor s-a menţionat că aceştia sînt compuşi optic activi. Interacţia lor cu enzimele, cu inducerea unor influenţe în complexul enzimă-substrat, este corelată cu stereoizomeria lor. Efectul inhibitor alosteric poate fi rezultatul unei competiţii directe între activatori şi inhibitori, prin intermediul unui compus comun stereoizomer, care poate induce legături atît cu activatorul, cît şi cu inhibitorul. Această dublă posibilitate este conferită numai substanţelor care prezintă alosterie, avînd două forme optic active în plus faţă de substanţele optic active obişnuite. Din această proprietate de a reacţiona ca efectori alosterici dubli decurge şi posibilitatea de a interveni în modularea activităţii enzimatice şi în procesele de autocontrol şi autoreglare metabolică.

Reprezentînd grafic, comparativ, relaţia dintre concentraţia substratului şi activitate, pentru reacţiile de ordinul I, normale şi alosterice, rezultă curbele reprezentate în figura 29.

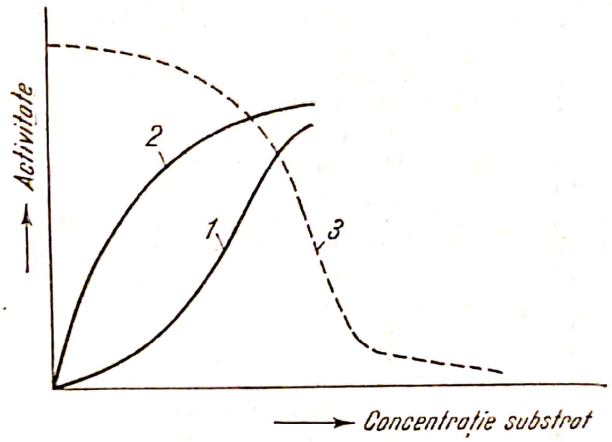


Fig. 29. Desfăşurarea reacţiilor biochimice în prezenţa unei enzime cu rol de reglare (1), a unei enzime fără însuşiri alosterice (2) şi în condiţiile creşterii în sistem a concentraţiei inhibitorului alosteric (3).

Pentru multe sisteme enzimatice cu acţiune reglatoare, curba de formă sigmoidă (1) din figura 29 arată că cel puţin două molecule de substrat interacţionează cu enzima şi legătura realizată în acest mod facilitează legarea moleculelor următoare.

Acest mod de legătură, prin care se antrenează mai mult de o moleculă de substrat pentru un centru activ al enzimei, se numeşte *efect cooperator*.

În cazul efectorilor alosterici, care leagă părţi active din catalizator, se sugerează că aceştia pot interacţiona cu efect activator sau inhibitor, legînd cel puţin o grupare funcţională activă a centrului enzimatic.

Controlul activităţii enzimelor alosterice cu rol de reglare se exercită deci prin intermediul moleculelor alosterice mici şi prezintă o importanţă cinetică evidentă pentru lămurirea mecanismului de *feed-back*, cît şi o importanţă majoră în cunoaşterea unor aspecte ale reacţiilor stereotipe de autoreglare şi autocontrol ale metabolismului intermediar celular.

Mecanismul alosteric este mult mai general decît exemplele de mai sus şi reprezintă una din multiplele posibilităţi prin care organismele vii îşi menţin echilibrul dinamic intern, în sincronism cu variaţiile permanente din mediul ambiant care acţionează asupra lui.

Modularea dintre organism şi mediu se face la nivelul celor aproximativ 2 000 de reacţii biochimice cunoscute pînă în prezent, catalizate de cel puţin tot atîtea enzime, dintre care multe cu însuşiri alosterice, în care sînt antrenate peste 100 000 de substanţe, pentru menţinerea capacităţii funcţionale normale a organismului uman. Tabelul 13 cuprinde cîteva enzime şi alţi compuşi cu însuşiri alosterice.

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL 13

Subunităţile constituţionale ale unor proteine şi enzime

Nr. crt.	Proteina	Masa moleculară	Subunităţile	
			nr. subunităţilor	masa moleculară
1	Insulina	11.466	2	5.733
2	Hemoglobina	64.500	4	16.000
3	Fosfataza alcalină	80.000	2	40.000
4	Creatinkinaza	80.000	2	40.000
5	Enolaza	82.000	2	41.000
6	Amilaza	97.600	2	48.000
7	Hexokinaza	102.000	4	27.000
8	Tirozinaza	128.000	4	32.000
9	*L*-aminoacidoxidaza	135.000	2	70.000
10	LDH	150.000	4	35.000
11	Ceruloplasmina	151.000	8	18.000
12	Histidindecarboxilaza	190.000	10	19.000
13	Catalaza	232.000	4	57.000
14	Apoferitina	480.000	20	24.000
15	Carboxidismutaza	515.000	24	22.000
16	Piruvatcarboxilaza	660.000	4	165.000
17	Virusul poliomelitei	5.500.000	130	27.000
18	Acetil-CoA-carboxilaza	300.000	2	150.000
19	Virusul mozaicului tutunului	40.000.000	2.130	17.500

5.3. CLASIFICAREA ŞI NOMENCLATURA ENZIMELOR

Pe măsură ce numărul enzimelor cunoscute s-a înmulţit, a devenit tot mai clar că utilizarea denumirilor specifice (de exemplu pepsină, tripsină etc.) trebuia înlocuită cu o denumire raţională şi ştiinţifică. S-au utilizat şi continuă să se utilizeze denumirile rezultate prin adăugarea sufixului „ază" la tipul reacţiei catalizate sau a substratului (urează, decarboxilază). Pe această bază enzimele au putut fi şi grupate : cele care catalizează reacţiile de oxidoreducere s-au numit oxireductaze, cele care favorizează reacţiile de transfer s-au numit transferaze etc.

În prezent denumirea enzimelor individuale include numele complet al substratului şi pe cel al reacţiei catalizate. De exemplu, enzima de decarboxilare a acidului glutamic se numeşte glutamicaciddecarboxilază (GAD), dehidrogenaza acidului lactic-lacticodehidrogenază (LDH) etc.

Pentru o clasificare cît mai sistematică s-a propus numerotarea cu un grup de patru cifre. Fiecare clasă principală se numerotează cu o cifră, de la 1 la 6. Subclaselor le revine a doua cifră, iar pentru enzimele singulare se vor folosi în continuare cifra a treia şi a patra. Această notare cifrică are avantajul că enzimele descoperite vor putea fi încadrate în tabelul celor existente. Notarea cu cifre serveşte totodată ca sistem de codificare pentru aparatele de calcul electronic, care îşi găsesc o utilizare din ce în ce mai largă şi în domeniul biologiei.

Avînd la bază aceste criterii de ordin general, considerate raţionale şi logice de către I.U.P.A.C. (Uniunea Internaţională de Chimie Pură şi Aplicată), cele şase clase principale cuprind fiecare un număr mai mare

Scanned with OKEN Scanner

sau mai mic de subclase, care la rîndul lor se subdivid în clase secundare după specificul de cataliză şi după natura substratului catalizat. Cele şase clase principale sînt următoarele :

— 1. *oxidoreductazele* sînt sisteme enzimatice care catalizează reacţii de tip redox. În aceste reacţii are loc transferul de electroni sau de hidrogen între diferiţi parteneri de reacţie. Energia liberă care se degajă în aceste reacţii constituie cea mai importantă sursă energetică pentru metabolismul celulei vii ;

— 2. *transferazele* sînt enzime care catalizează reacţiile de transfer al unui fragment molecular de pe un substrat pe altul. Energia implicată în timpul acestei transformări este de multe ori apropiată ca valoare de cea care rezultă din reacţiile redox ;

— 3. *hidrolazele* cuprind enzimele care catalizează reacţiile de scindare a substratului cu participarea elementelor apei ;

— 4. *liazele* catalizează reacţiile de desfacere în care nu apar fenomene de tip redox sau de hidroliză ;

— 5. *izomerazele* sînt sisteme enzimatice care catalizează reacţiile de izomerizare a substanţelor optic active ;

— 6. *ligazele* catalizează reacţii în care se formează legături chimice noi, energia necesară fiind furnizată de ATP.

În tabelul 14 se prezintă sistemul actual al clasificării enzimelor.

5.4. DESCRIEREA PRINCIPALELOR CLASE DE ENZIME

5.4.1. OXIDOREDUCTAZELE

Stabilind că organismele animale consumă oxigen pe seama căruia se formează CO_2, Lavoisier şi Laplace au considerat, în jurul anului 1780, că în organism au loc procese de oxidare asemănătoare arderii. Treptat a devenit însă clar faptul că între arderea propriu-zisă şi oxidarea biologică sînt diferenţe semnificative. De exemplu, caracteristic pentru procesele de ardere este ridicarea temperaturii şi dezvoltarea de căldură, pe cîtă vreme în organismul animalelor toate procesele se desfăşoară la o temperatură constantă, energia apărînd numai parţial sub formă de căldură, o parte însemnată fiind conservată ca energie chimică.

Se poate considera că oxidarea biologică a substanţelor alimentare (glucide, lipide şi proteine) are loc în următoarele etape :

— moleculele organice mari sînt degradate pînă la fragmente de doi atomi de carbon (acetat activ) ;

— degradarea în continuare a fragmentului de doi atomi de carbon se face prin punerea în libertate a unei molecule de CO_2 şi hidrogen ;

— apariţia CO_2 final are loc prin decarboxilarea acizilor organici ;

— apa, ca produs final, rezultă în organism printr-un proces enzimatic, în care substanţele donatoare de hidrogen în lanţul respirator îl pun în libertate ca proton, care se va uni ulterior cu ionul de oxigen.

Pentru tratarea mai în amănunt a oxidării biologice sînt necesare cîteva noţiuni generale de oxidoreducere.

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL

Clasificarea enzimelor (adoptată de IUB)

1. *OXIDOREDUCTAZE*

1.1. Care acționează asupra grupării $>CH-OH$;

1.1.1. cu NAD^+ sau $NADP^+$ ca acceptor;
1.1.2. cu citocromi ca acceptori;
1.1.3. cu O_2 ca acceptor;
1.1.99. cu alți acceptori.

1.2. Care acționează asupra grupărilor aldehidice sau cetonice:

1.2.1. cu NAD^+ sau $NADP^+$ ca acceptor;
1.2.2. cu citocromi ca acceptori;
1.2.3. cu O_2 ca acceptor;
1.2.99. cu alți acceptori.

1.3. Care acționează asupra grupării $>CH-CH<$ *:*

1.3.1. cu NAD^+ sau $NADP^+$ ca acceptor;
1.3.2. cu citocromi ca acceptori;
1.3.3. cu O_2 ca acceptor;
1.3.99. cu alți acceptori.

1.4. Care acționează asupra grupării $>CH-NH_2$*:*

1.4.1. cu NAD^+ sau $NADP^+$ ca acceptor;
1.4.3. cu O_2 ca acceptor.

1.5. Care acționează asupra grupării $>C=NH$*:*

1.5.1. cu NAD^+ și $NADP^+$ ca acceptor;
1.5.3. cu O_2 ca acceptor.

1.6. Care acționează asupra NADH *sau* NADPH*:*

1.6.1. cu NAD^+ sau $NADP^+$ ca acceptor;
1.6.2. cu citocromi ca acceptori;
1.6.4. cu un compus disulfuric ca acceptor;
1.6.5. cu chinone sau compuși similari ca acceptor;
1.6.99 cu alți acceptori.

1.7. Care acționează asupra altor compuși azotați:

1.7.3. cu O_2 ca acceptor;
1.7.99. cu alți acceptori.

2. *TRANSFERAZE*

2.1. Care transferă grupări cu un singur carbon:

2.1.1. metiltransferaze;
2.1.2. hidroximetiltransferaze, formiltransferaze și transferaze similare;
2.1.3. carboxiltransferaze și carboniltransferaze.

2.2. Care transferă grupările aldehidice sau cetonice:

2.3. Aciltransferaze:
2.3.1. acetiltransferaze;
2.3.2. aminoaciltransferaze.

Scanned with OKEN Scanner

2.4. Glicoziltransferaze:

2.4.1. hexoziltransferaze;
2.4.2. pentoziltransferaze.

2.6. Care transferă grupări cu azot:

2.6.1. aminotransferaze;
2.6.2. amidintransferaze;
2.6.3. oxiimintransferaze.

2.7. Care transferă grupări cu fosfor:

2.7.1. fosfotransferază cu grupare alcoolică ca acceptor;
2.7.2. fosfotransferază cu grupare carboxilică ca acceptor;
2.7.3. fosfotransferază cu grupare conținînd azot ca acceptor;
2.7.4. fosfotransferază cu grupare fosforică ca acceptor;
2.7.5. fosfotransferază pseudointramoleculară;
2.7.6. pirofosfattransferază;
2.7.7. nucleotidiltransferază.

2.8. Care transferă grupările cu sulf:

2.8.1. sulftransferază;
2.8.2. sulfotransferază;
2.8.3. CoA-transferază.

3. *HIDROLAZE*

3.1. Care acționează asupra legăturilor esterice:

3.1.1. hidrolazele esterilor carboxilici;
3.1.2. hidrolazele esterilor tiolici;
3.1.3. hidrolazele esterilor monofosforici;
3.1.4. hidrolazele esterilor difosforici;
3.1.5. hidrolazele monoesterilor trifosfaților;
3.1.6. hidrolazele esterilor acidului sulfuric.

3.2. Care acționează asupra compușilor glicozidici.

3.3. Care acționează asupra tioesterilor.

3.4. Care acționează asupra legăturilor peptidice (hidrolaze peptidice):

3.4.1. hidrolazele aminopeptidice ale aminoacizilor;
3.4.2. hidrolazele carboxipeptidice ale aminoacizilor;
3.4.3. hidrolazele dipeptidice ale peptidelor.

3.5. Care acționează asupra altor legături C—N*:*

3.5.1. hidrolazele aminelor cu catenă liniară;
3.5.2. hidrolazele aminelor ciclice;
3.5.3. hidrolazele aminelor în catenă;
3.5.4. hidrolazele aminelor ciclice;
3.5.99. hidrolazele altor compuși amidici.

3.6. Care acționează asupra legăturilor din anhidridele acizilor.

3.7. Care acționează asupra legăturii $>C-C<$.

3.8. Care acționează asupra legăturilor halogenilor:

3.8.1. asupra compușilor C-halogenați;
3.8.2. asupra compușilor P-halogenați.

3.9. Care acționează asupra legăturii — P—N.

Scanned with OKEN Scanner

4. *LIAZE*

4.1. Liaze carbon-carbon:

4.1.1. carboxilaze;
4.1.2. aldehidliaze;
4.1.3. liazele cetoacizilor.

4.2. Liaze carbon-oxigen:

4.2.1. hidroliaze;
4.2.99. celelalte liaze carbon-oxigen.

4.3. Liaze carbon-azot:

4.3.1. amoniacliaze;
4.3.2. amidinliaze.

4.4. Liaze carbon-sulf.

4.5. Liaze carbon-halogen.

5. *IZOMERAZE*

5.1. Racemaze și epimeraze:

5.1.1. care acționează asupra aminoacizilor și a derivaților acestora;
5.1.2. care acționează asupra hidroxiacizilor și a derivaților acestora;
5.1.3. care acționează asupra hidraților de carbon și a derivaților acestora.

5.2. Izomeraze — cis-trans.

5.3. Oxidoreductaze intramoleculare:

5.3.1. care transformă aldozele în cetoze și cetozele în aldoze;
5.3.2. care transformă grupările cetonice în enolice și cele enolice în cetonice;
5.3.3. care modifică poziția dublelor legături.

5.4. Transferaze intramoleculare:

5.4.1. care produc transpoziții ale grupărilor acilice;
5.4.2. care produc transpoziții ale grupărilor fosforice;
5.4.99. care produc transpoziții ale altor grupări.

5.5. Liaze intramoleculare.

6. *LIGAZE*

6.1. Care produc legături C—O*:*

6.1.1. ligaze aminoacid-ARN.

6.2. Care produc legături C—S*:*

6.2.1. ligaze acid-tiol.

6.3. Care produc legături C—N*:*

6.3.1. ligaze acid-amoniac (sintetazele amidelor);
6.3.2. ligaze acid-aminoacid (sintetazele peptidelor);
6.3.3. cicloligaze;
6.3.4. alte ligaze;
6.3.5. C—N ligaze cu glutamină ca donator de azot.

6.4. Care produc legăturile C—C*:*

6.4.1. care introduc CO_2;
6.4.1.1. piruvat-CO_2—ligaze;
6.4.1.2. acetil-CoA-carboxilază.

Scanned with OKEN Scanner

În decursul timpului, oxidoreducerea a fost interpretată ca fiind :
— combinare cu oxigenul ;
— pierdere de hidrogen ;
— pierdere de electroni (creşterea sarcinii pozitive).

De fapt primele două se reduc tot la ultimul proces, reacţiile redox fiind un transfer de electroni între două substanţe : una care cedează electroni — se oxidează, iar a doua care primeşte aceşti electroni — se reduce.

Oxidarea hidrogenului se poate formula astfel :

$$H_2 \xrightarrow{-2e^-} 2H^+$$

Electronii eliberaţi de H_2 trebuie să fie acceptaţi de substanţa care se reduce. Dacă se foloseşte o sare ferică, ecuaţia va fi de forma :

$$H_2 - 2e^- = 2\,H^+$$
$$2\,Fe^{3+} + 2e^- = 2\,Fe^{2+}$$
$$\overline{\qquad\qquad\qquad\qquad}$$
$$H_2 + 2\,Fe^{3+} = 2\,H^+ + 2\,Fe^{2+}$$

În acelaşi mod se comportă şi oxigenul, care în funcţie de forma sub care intră în reacţie, ca oxigen atomic sau oxigen molecular, poate primi doi sau patru electroni :

$$O + 2e^- \rightarrow O^{2-}\,; \qquad O^{2-} + 2\,H^+ \rightarrow H_2O$$

$$O_2 + 4e^- \rightarrow 2\,O^{2-}\,; \qquad 2\,O^{2-} + 4\,H^+ \rightarrow 2\,H_2O$$

Pierderea de electroni de către hidrogen şi acceptarea de către oxigen pot fi cuplate în felul următor :

$$2\,H_2 - 4e^- = 4\,H^+$$
$$O_2 + 4e^- = 2\,O^{2-}$$
$$\overline{\qquad\qquad\qquad\qquad}$$
$$2\,H_2 + O_2 = 2\,H_2O\,;\ \Delta G = -57\ \text{kcal/mol}\ H_2O$$

În chimia organică, oxidarea prin pierdere de hidrogen trebuie înţeleasă tot ca o pierdere de electroni. De exemplu, oxidarea unui alcool primar la aldehidă :

$$\underset{\text{alcool}}{R-CH_2-OH} \overset{-H^+}{\rightleftharpoons} \underset{\text{alcoolat}}{R-CH_2-\ddot{O}:} \overset{-1e^-;\,-H}{\rightleftharpoons} \underset{\text{aldehidă}}{R-C\begin{matrix}\diagup\!\!\diagup \ddot{O} \\ \diagdown H\end{matrix}}$$

Se observă că oxidarea o suferă ionul de alcoolat obţinut prin ionizarea alcoolului.

5.4.1.1. *Potențialul redox* caracterizează fiecare sistem enzimatic de oxidoreductaze. Procesul de oxidoreducere, constînd în transferul de electroni, necesită cel puțin trei parteneri : un donor de electroni, un transportor și un acceptor. În timpul cedării electronilor de la donor la acceptor se creează o diferență de potențial care va fi cu atît mai mare cu cît compusul care primește electroni are o afinitate mai mare pentru aceștia.

Potențialul de oxidoreducere măsoară deci intensitatea schimbului de electroni al unui sistem redox. Acest schimb este în funcție de afinitatea celor doi parteneri față de electronii pierduți, respectiv cîștigați. Din aceste considerente, diferența de potențial care ia naștere este o măsură a variației de energie liberă (ΔG), direct proporțională cu E_0 (variația diferenței de potențial).

Legătura dintre variația potențialului de oxidoreducere (ΔE_0) și variația energiei libere ($\Delta G°$) se exprimă astfel :

$$-\Delta G° = nF \cdot \Delta E_0$$

în care :

n este numărul de electroni schimbați ;
F — numărul lui Faraday (96 500 coulombi).
Un exemplu îl oferă următoarea reacție de oxidoreducere :

$$1/2\ O_2 + 2\text{Cit.}c \cdot Fe^{2+} + 2H^+ \rightarrow 2\ \text{Cit.}c \cdot Fe^{3+} + H_2O$$

care a fost studiată *in vitro* în următoarele condiții :

$$p\text{H} = 7{,}0\,;\ E_0 = 0{,}55\ \text{V};\ \text{t} = 20°\text{C}$$

Energia calculată este :

$$-\Delta G = (2 \cdot 96\,500 \cdot 0{,}55) = 106\,172 \text{ jouli}$$

$$-\Delta G = \frac{106\,172}{-4{,}14} = 25\,400 \text{ cal/mo}$$

Transferul unui mol de electroni la o diferență de potențial de 1 V furnizează 23,07 kcal. Energiei libere rezultate prin hidroliza ATP (ΔG = = 7 kcal/mol) îl corespunde o diferență de potențial de 0,152 V.

Potențialul redox al unui sistem oarecare se poate calcula după ecuația lui Nernst:

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{Ox}]}{[\text{Red}[}$$

sau

$$E = E_0 + \frac{2{,}303RT}{nF} \log \frac{[\text{Ox}]}{[\text{Red}]}$$

Scanned with OKEN Scanner

în care :

R este constanta generală a gazelor (2 cal); T — temperatura absolută în °K; n — numărul lui F a r a d a y (96 500 coulombi); E_0 — potențialul normal; [Ox] și [Red] — concentrațiile formei oxidate și a celei reduse.

Potențialul normal (E_0) este o caracteristică a fiecărui sistem redox și este funcție de pH și temperatură. Acest potențial este considerat ca măsură a capacității de oxidare sau reducere a unui sistem redox, permițînd compararea diferitelor sisteme.

Cum în majoritatea reacțiilor biochimice de tip redox participă ioni de hidrogen pentru a se putea obține potențialele standard ar trebui ca $[H^+] = 1$ mol și măsurarea să se facă la pH $= 0$. Lucrul acesta nu este însă posibil, deoarece la acest pH enzimele sînt inactivate și trebuie deci să alegem condiții fiziologice, compatibile cu viața. Din acest motiv, în biochimie se recurge la potențialele E_0 raportate la pH $= 7$. La acest pH, electrodul de hidrogen, care se utilizează în practică pentru determinarea potențialului, prezintă față de același electrod aflat la pH $= 0$ o diferență de potențial de $-0{,}42$ V.

5.4.1.2. *Noțiunea de* rH derivă din ecuația N e r n s t: în formula generală a lui N e r n s t pentru calcularea potențialelor redox nu intră pH-ul, care este însă un parametru important în activitatea enzimelor. Din acest considerent, C l a r k propune o exprimare a potențialelor care să conțină și pH-ul sistemului. Potențialul calculat în acest mod se exprimă prin mărimea numită rH, ale cărei valori pot fi calculate tot din ecuația lui N e r n s t.

Se consideră un electrod normal de hidrogen, adică un electrod confecționat din platină platinată pe care se suflă un curent de H_2 la presiunea de 1 atm, electrodul fiind cufundat într-o soluție în care concentrația H^+ este 1 (soluția 1 N de HCl). Între H_2 și H^+ se stabilește echilibrul :

$$H_2 \rightleftharpoons 2H^+ + 2e^-$$

Scriind ecuația lui N e r n s t pentru acest sistem și ținînd seama că în condițiile alese $E_0 = 0$, se obține :

$$E_H = \frac{RT}{nF} \ln \frac{[H^+]^2}{[H_2]}$$

Înlocuind valorile lui R, T, n și F, trecînd la logaritmi zecimali și ținînd seama că H_2 se poate exprima prin P_{H_2}, obținem :

$$E_H = 0{,}029 \log \frac{[H^+]^2}{P_{H_2}} = 0{,}058 \log[H^+] - 0{,}029 \log P_{H_2}$$

Dacă se ține seama de definiția pH-ului (pH $= -\log [H^+]$) și se scrie de asemenea prin definiție $-\log P_{H_2} = r$H, se obține :

$$E_H = 0{,}029\, r\text{H} - 0{,}058\, p\text{H}$$

Scanned with OKEN Scanner

respectiv :

$$rH = \frac{E_H + 0{,}058\ pH}{0{,}029}$$

Pentru $pH = 0$:

$$rH = \frac{E_H}{0{,}029}$$

Valorile rH care se calculează cu această relație sînt cuprinse între 0 (care este sistemul reducător de referință, $P_{H_2} = 1$ atm) și 41 (corespunzînd înlocuirii H_2 cu O_2 la presiunea de 1 atm). Valorile rH ale cîtorva sisteme sînt date în tabelul 15.

TABELUL 15

Potențialul redox și rH-ul unor sisteme enzimatice la $pH = 7$

Sistemul	E_0 (volți)	rH	Temperatura (°C)
Fe^{3+}/Fe^{2+}	0,77	39,6	25
Hem : Fe^{3+}/Fe^{2+}	−0,23	6,4	30
Citocrom *b* : Fe^{3+}/Fe^{2+}	+0,04	12,6	20
Citocrom *c* : Fe^{3+}/Fe^{2+}	0,26	22,7	25
Citocrom *a* : Fe^{3+}/Fe^{2+}	0,29	23,8	20
Hidrogen ion H^+/H	0	14,0	25
O_2/H_2O	0,26	22,7	25
$NAD^+/NADH$	−0,28	4,8	30
$FAD/FADH_2$	−0,18	7,8	20
Chinonă/chinol	0,28	23,3	25
Luciferină : ox/red	−0,05	12,3	18
Adrenalină : ox/red	0,38	26,3	30
Cistină/cisteină	−0,14	9,3	25
Glutation : ox/red	0,04	15,4	25
Piruvat/lactat	−0,18	8,2	35
Fumarat/succinat	0,03	14,0	25

S-a putut determina rH-ul în interiorul diferitelor celule. De exemplu, bacteriile anaerobe prezintă un rH vecin lui zero, în timp ce celulele în care se produc procese aerobe au rH-ul mult mai ridicat.

Dezvoltarea diferitelor celule sau chiar organisme nu este posibilă decît între anumite limite ale rH, caracteristice speciei considerate. Deasupra și dedesubtul unor valori critice viața nu este posibilă.

5.4.1.3. *Factorii care influențează potențialul redox* sînt numeroși. Capacitatea oxidantă sau reducătoare a unui sistem depinde în special de doi factori, și anume :

— potențialul normal al substanțelor reactante, care este o caracteristică chimică a fiecărui compus ;

— raportul concentrațiilor celor două forme, oxidată și redusă, a sistemului considerat.

Din expresia potențialului :

$$E = E_0 + \frac{0{,}058}{n} \log \frac{[Ox]}{[Red]}$$

Scanned with OKEN Scanner

se vede că, pentru a evalua puterea oxidantă sau reducătoare a unui sistem, trebuie să se ia în considerare atît potenţialul normal E_0, cît şi raportul concentraţiilor celor două forme. Este ştiut însă că în cazul reacţiilor care se petrec în soluţie, starea de echilibru este determinată nu de concentraţiile participanţilor, ci de activitatea acestora, de concentraţiile active.

Pentru a putea calcula valoarea potenţialului unui sistem, va trebui să se considere activităţile oxidantului şi reducătorului, iar formula devine :

$$E = E_0 + \frac{0{,}058}{n} \log \frac{f_{ox}}{f_{red}}$$

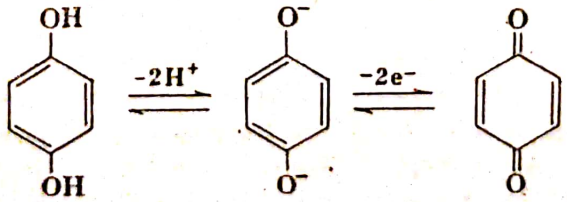
în care f_{ox} şi f_{red} sînt coeficienţii de activitate ai oxidantului şi reducătorului în soluţia respectivă. Deoarece determinările riguroase, care să corespundă formulei de mai sus, sînt dificile, în tabele se dau aşa-numitele potenţiale normale aparente ale diferitelor sisteme.

Valoarea potenţialelor normale aparente este în funcţie de condiţiile de lucru : *p*H-ul, prezenţa altor sisteme redox, scoaterea unui component din sistem etc., factori care în mediile biologice sînt foarte numeroşi şi de care trebuie să se ţină seama.

Concentraţia ionilor de hidrogen modifică mult viteza de reacţie, prin influenţarea gradului de disociere a componenţilor. În cazul reacţiilor biologice, ionul de hidrogen este totdeauna prezent şi reacţionează cu oxigenul formînd apă. Deci, pentru aceste sisteme se poate scrie o reacţie de forma generală :

$$Red \cdot H_2 \rightleftharpoons Ox + 2\,H^+ + 2\,e^-.$$

De exemplu, oxidarea hidrochinonei la chinonă, în care sistemul redox funcţionează ca un acid slab, bibazic, se face mai întîi prin eliberarea a $2H^+$ în mediul de reacţie, ulterior avînd loc cedarea celor doi electroni, după reacţia :



hidrochinonă chinonă

Aplicînd legea acţiunii maselor la disocierea formei reduse ca acid slab bazic, rezultă :

$$Red \cdot H_2 \rightleftharpoons Red \cdot H^- + H^+$$

$$Red \cdot H^- \rightleftharpoons Red^{-2} + H^+$$

pentru care constanta de disociere este :

$$K_1 = \frac{[\text{Red}\cdot\text{H}^-]\cdot[\text{H}^+]}{[\text{Red}\cdot\text{H}_2]}$$

$$K_2 = \frac{[\text{Red}^{-2}]\cdot[\text{H}^+]}{[\text{Red}\cdot\text{H}^-]}$$

În relaţia pentru calcularea valorii potenţialului se pot neglija cele două constante şi se obţine :

$$E = E_0 + \frac{2{,}303\cdot RT}{2F}\log\frac{[\text{Ox}]}{[\text{Red}]} + \frac{2{,}303\cdot RT}{2F}\log[\text{H}^+]^2$$

în care, înlocuind termenii pentru temperatura de 30°C, rezultă :

$$E = E_0 + 0{,}03\log\frac{[\text{Ox}]}{[\text{Red}]} + 0{,}03\cdot 2\log[\text{H}^+]$$

$$E = E_0 + 0{,}03\log\frac{[\text{Ox}]}{[\text{Red}]} - 0{,}06\ p\text{H}$$

cînd [Ox] = [Red] relaţia devine :

$$E = E_0 - 0{,}06\ p\text{H}$$

Din ultima relaţie reiese că potenţialul normal redox variază liniar în funcţie de *p*H şi anume, pentru o creştere de *p*H cu o unitate, potenţialul normal redox scade cu 0,06 V.

Pentru mediile biologice, al căror *p*H este, de obicei, în jurul lui 7, relaţia se poate scrie, în cazul în care numărul electronilor (n) este altul decît 2, astfel :

$$E_{p\text{H}_7} = E_{0p\text{H}_7} + \frac{0{,}06}{n}\log\frac{[\text{Ox}]}{[\text{Red}]}$$

5.4.1.4. *Modificările de energie liberă în reacţiile redox* depind de parcenerii de reacţie. În reacţiile redox potenţialele normale ale compuşilor care iau parte la reacţie sînt semnificative în orientarea sensului desfăşurării reacţiei şi permit calcularea energiei libere a sistemului. De exemplu, pentru două sisteme care reacţionează în modul următor :

$$\text{Red}_1 + \text{Ox}_2 \rightleftharpoons \text{Ox}_1 + \text{Red}_2$$

Aplicînd, la atingerea echilibrului, legea acţiunii maselor se obţine :

$$K = \frac{[\text{Ox}_1]\cdot[\text{Red}_2]}{[\text{Ox}_2]\cdot[\text{Red}_1]};$$

Scanned with OKEN Scanner

potenţialele redox ale celor două sisteme fiind egale la starea de echilibru ecuaţia se poate scrie :

$$E = E_{0_1} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[Ox_1]}{[Red_1]} = E_{0_2} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[Ox_2]}{[Red_2]}$$

Pentru ca reacţia să aibă loc, trebuie ca diferenţa de potenţial $E = E_{0_1} - E_{0_2}$ să fie pozitivă.

$$\Delta E_0 = \frac{RT}{nF} \ln \frac{[Ox_1]}{[Red_1]} - \frac{RT}{nF} \ln \frac{[Ox_2]}{[Red_2]}$$

$$\Delta E_0 = \frac{RT}{nF} \left(\ln \frac{[Ox_1]}{[Red_1]} - \ln \frac{[Ox_2]}{[Red_2]} \right)$$

$$\Delta E_0 = \frac{RT}{nF} \ln \frac{[Ox_1] \cdot [Red_2]}{[Red_1] \cdot [Ox_2]}$$

$$\Delta E_0 = - \frac{RT \ln K}{nF}$$

de unde :

$$\Delta E_0 nF = - RT \ln K.$$

Pe de altă parte :

$$\Delta G^\circ = -nF \Delta E_0$$

Valoarea lui F este de 23 063 cal/volt echivalent. În cazul unei reacţii redox care se petrece la 30°C şi care are $E_0 = 0{,}1$ V, dacă se transferă un singur electron, variaţia de $\Delta G_0 = -0{,}1 \cdot 1 \cdot 23\,063 = -2\,306$ cal.

Reacţia este exergonică şi se va cupla cu una endergonică pentru a consuma o parte din energia eliberată conform principiului cuplării reacţiilor exoendergonice.

La nivelul celulei, procesele sînt mai complexe, deoarece aici participă simultan mai multe sisteme redox cu potenţiale normale apropiate. Dintre multiplii factori care contribuie la desfăşurarea acestor reacţii, fără îndoială că potenţialului normal de oxidoreducere a elementelor îi revine rolul dominant şi coordonator. Lanţul respirator de oxidoreducere celulară se va desfăşura în ordinea valorilor potenţialelor normale ale fiecărui component, trecînd de la valorile electronegative la cele neutre şi de la acestea la sistemele electropozitive.

Perturbaţia unei secvenţe din această succesiune de reacţii, care se petrec conform legilor termodinamicii şi cineticii biochimice, duce la apariţia unei leziuni moleculare, care mai devreme sau mai tîrziu, se va reflecta printr-o dereglare funcţională.

Diversele tulburări metabolice din procese infecţioase, boli cardiovasculare, afecţiuni cerebrale şi chiar pierderea controlului diviziunii celulare sînt aspecte ale dereglării secvenţelor de oxidoreducere celulară.

Scanned with OKEN Scanner

Din figura 30, în care este reprezentat lanțul respirator în corelație cu metabolismele glucidic, lipidic și protidic, se ploate urmări cum inhibarea unei secvențe din lanțul respirator, ceea ce corespunde unei modificări a potențialului de oxidoreducere, va induce din aproape în aproape, prin mecanismul de *feed-back*, modificări în întregul complex de reacții din metabolismul intermediar.

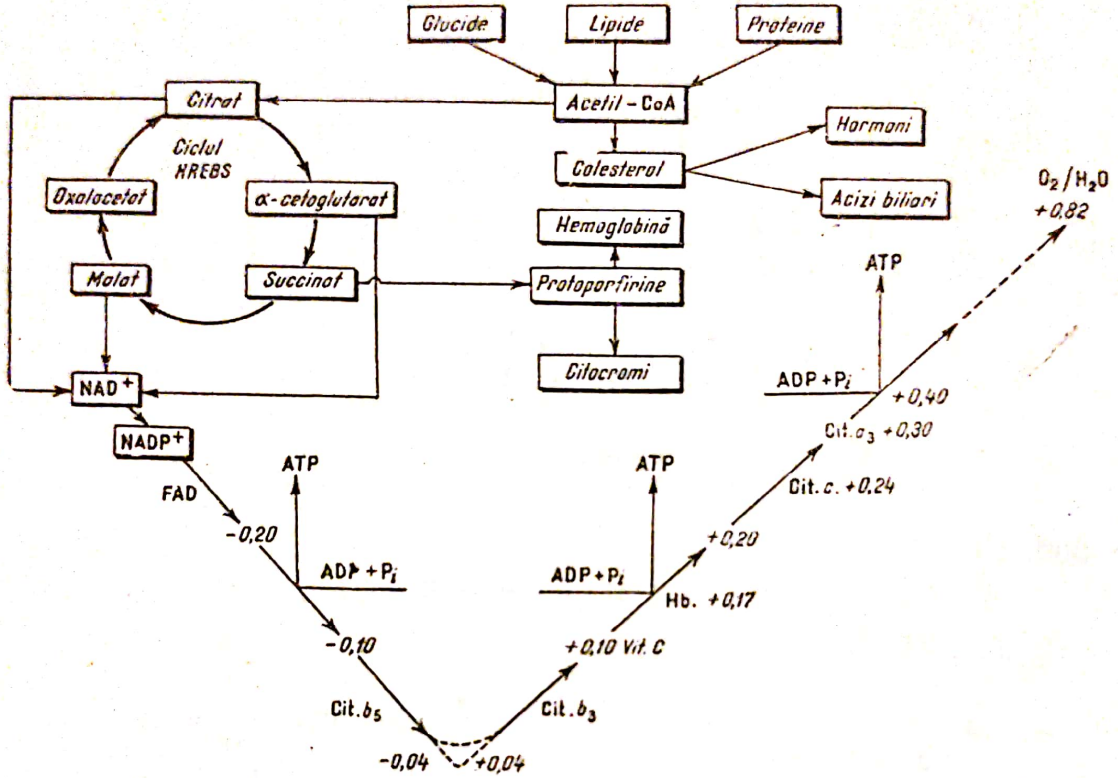


Fig. 30. Corelarea potențialelor redox ale lanțului respirator în metabolismul intemediar.

Studiind aceste procese, s-a arătat că cel mai ușor poate fi dereglat lanțul respirator între limitele de potențial cuprins între valorile negative de −0,04 V și pozitive de 0,04 V. În acest interval, de potențial redox se face trecerea de la sistemele electronegative la cele electropozitive, unde sînt secvențe de compuși care se comportă atît electronegativ, cît și electropozitiv din cauza structurii lor complexe (citocromi b_5, b_6, unele flavoproteine), și care induc semnale oscilatorii în reacțiile redox. Energia de interacțiune pentru perturbația sistemului are o valoare scăzută, explicație a multiplelor forme de energie care produc același efect (radiații, virusuri, substanțe chimice, *stress*-uri psihice).

5.4.1.5. *Principalele sisteme enzimatice de oxidoreducere*

5.4.1.5.1. *Enzimele nicotinamidice.* Oxidoreductazele care conțin în molecula lor nicotinamidă sînt foarte numeroase. În clasificarea prezentată anterior s-a arătat că asemenea enzime pot acționa asupra unor legături ca $>C-OH$, $>C=O$; $>C-C<$; $>C-NH_2$ etc. Mai numeroase sînt cele

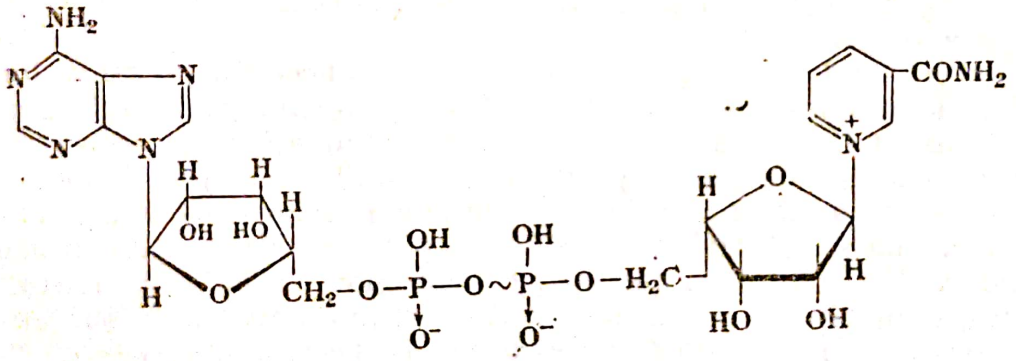
care catalizează specific oxidarea substratului în a cărui structură se află grupări funcţionale de tipul $>CH-OH$, cum sînt hidroxiacizii (acidul malic, acidul citric, acidul lactic), alcoolii secundari (glicerina şi unii compuşi ai săi), glucidele şi alţi compuşi hidroxilaţi.

Potenţialul redox al acestor sisteme enzimatice este electronegativ, oxidoreductazele fiind primele enzime care intră în lanţul respirator în contact cu substratul. Unele dintre reacţiile catalizate de aceste sisteme au un pronunţat caracter reversibil. Din acest motiv putem schematiza modul lor de acţiune prin ecuaţia :

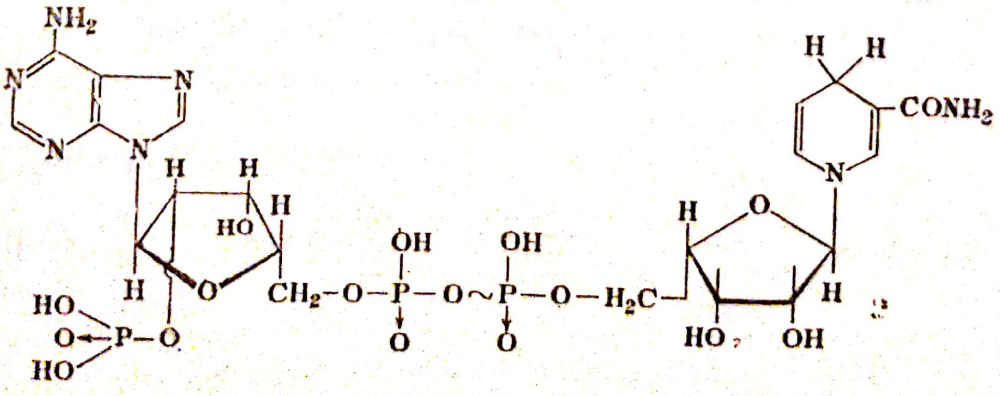
$$\text{Substrat redus} + NAD^+ \rightleftharpoons \text{Substrat oxidat} + NADH + H^+$$

Existenţa unor factori termostabili, cu proprietăţi oxidoreducătoare, în drojdia de bere (numiţi cozimaza I şi II) a fost semnalată de H a r d e n şi Y o u n g (1904), dar izolarea lor a fost făcută mai tîrziu de E u l e r şi apoi de W a r b u r g şi C h r i s t i a n (1936). Se mai numesc şi coenzime (CoI) sau codehidrogenaze şi mai importante sînt două : NAD^+ şi $NADP^+$.

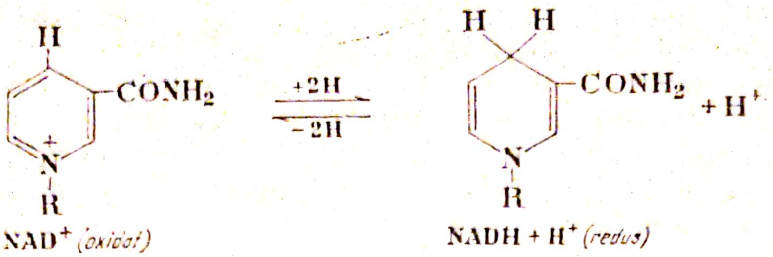
Din punct de vedere chimic, se poate considera că sînt formate din condensarea a două nucleotide prin intermediul acidului fosforic. Un nucleotid este cel derivînd de la adenină, iar al doilea este un „fals nucleotid" care derivă de la piridină, respectiv amida acidului nicotinic (vitamina PP) :



Structura $NADP^+$ diferă de cea NAD^+ numai printr-o moleculă de acid fosforic în plus :



Mecanismul de acţiune a acestor enzime are loc prin transferul hidrogenului de la substrat la nucleul piridinic, reprezentat global astfel :



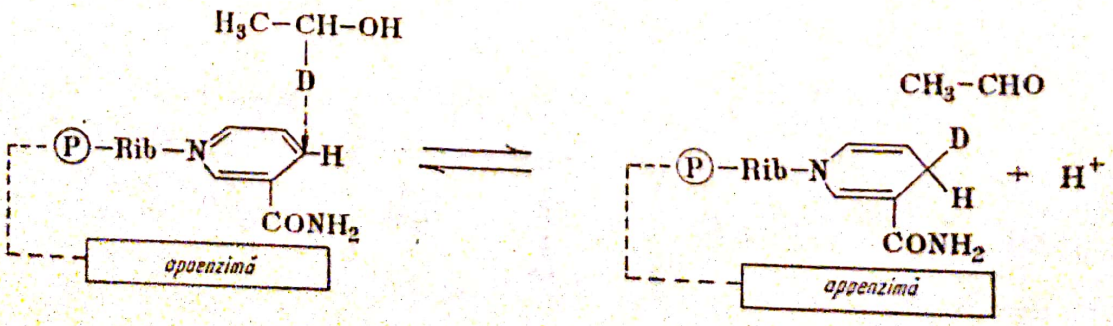
Prin adiţia hidrogenului se trece de la o formă aromatică la una chinonică. În acelaşi timp se schimbă şi maximul de absorbţie a luminii, de la $\lambda = 260$ nm la $\lambda = 360$ nm ; această modificare în spectrul de absorbţie permite urmărirea cu ajutorul spectrofotometrului a reacţiilor de oxido-reducere catalizate de enzime cu NAD^+ sau $NADP^+$.

Mecanismul reacţiilor catalizate de enzime nicotinamidice a fost intens studiat, cunoscîndu-se cîteva detalii importante :

— în general, reacţiile catalizate sînt reversibile, deci se pot realiza atît reacţii de dehidrogenare, cît şi de hidrogenare a substratelor. În acest sens, funcţia enzimelor cu NADPH diferă de a celor cu NADH : NADPH pune la dispoziţia diverselor procese de biosinteză hidrogenul necesar, în timp ce NADH îşi cedează hidrogenul cu predilecţie lanţului respirator, acest hidrogen servind pînă la urmă la formarea apei, concomitent cu producerea de energie ;

— marea majoritate a reacţiilor catalizate necesită prezenţa ionilor de Zn^{2+}. Valenţa zincului nu se modifică în cursul catalizei : rolul lui poate fi deci de fixare a substratului, de activare a complecşilor intermediari, de menţinere a unei configuraţii geometrice favorabile, de polarizare a substratului pentru a uşura transferul de ioni de hidrogen, de a lega apoenzima, coenzima şi substratul. Necesitatea prezenţei Zn^{2+} apare pregnant în cazul ADH : inhibitorii formării complexelor cu Zn^{2+} şi substanţele ce extrag unul din cei patru ioni de Zn^{2+} reduc activitatea enzimatică ;

— enzimele nicotinamidice prezintă o specificitate stereochimică, tradusă prin faptul că hidrogenul preluat de la substrat la carbonul opus atomului de azot, se fixează, după caz, de o parte sau de cealaltă parte a planului inelului piridinic. Aceasta dovedeşte că în fiecare dehidrogenază inelul piridinic este aplecat (culcat) cu o faţă pe apoenzimă. S-a putut demonstra existenţa stereospecificităţii utilizîndu-se substraturi cu deuteriu, ca de exemplu, în cazul ADH :



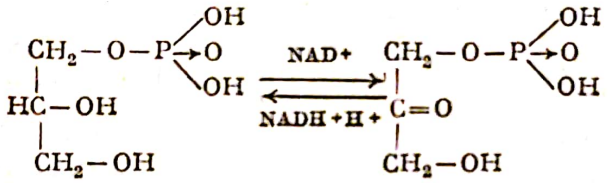
Faţa inelului piridinic pe care se fixează hidrogenul în procesul de oxidare a alcoolului etilic prin ADH şi a acidului lactic prin LDH se notează cu α, cealaltă accesibilă hidrogenului în cazul GDH şi triozofosfat-dehidrogenazei se notează cu β.

Dintre numeroasele enzime din care fac parte, ca grupare prostetică NAD^+ şi $NADP^+$, pot fi amintite următoarele:

— *ADH* catalizează reacţia reversibilă de transformare a alcoolului etilic în acetaldehidă; reacţia reprezintă etapa finală a fermentaţiei alcoolice:

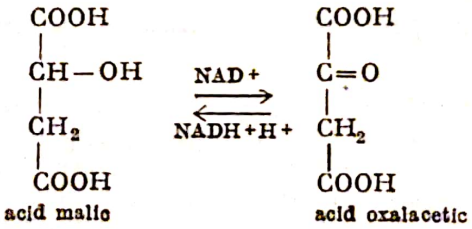
$$CH_3-CH=O + NADH + H^+ \rightleftharpoons CH_3-CH_2-OH + NAD^+$$

— *α-glicerofosfatdehidrogenaza* prezentă în drojdie, celulele animale şi vegetale şi care catalizează dehidrogenarea substratului conform reacţiei:



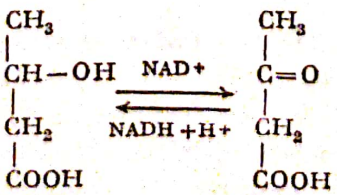
α-glicerofosfat fosfodihidroxiacetonă

— *malicdehidrogenaza*, care transformă acidul malic în acid oxalacetic, după reacţia:



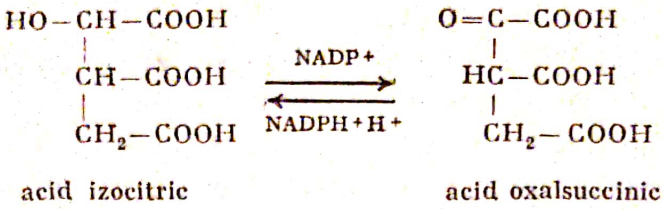
acid malic acid oxalacetic

— *hidroxibutiricdehidrogenaza*, enzima care dehidrogenează acidul β-hidroxibutiric, trecîndu-l în acid acetilacetic:



acid β-hidroxibutiric acid acetilacetic

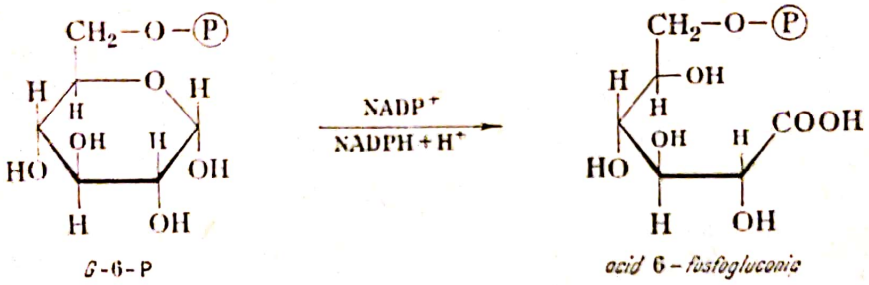
— *D-izocitricdehidrogenaza*, importantă în ciclul acizilor tricarboxilici, face trecerea acidului *D*-izocitric în acid oxalsuccinic :



acid izocitric — acid oxalsuccinic

activitatea enzimei necesită prezenţa Mg^{2+} sau Mn^{2+}, iar reacţia de dehidrogenare este urmată de una de decarboxilare ;

— *glucozo-6-fosfatdehidrogenaza* (*Zwischenferment Warburg-Christian*)



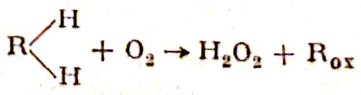
G-6-P — acid 6-fosfogluconic

— *glutationreductazele* participă la oxidoreducerea glutationului :

$$2\,G{-}SH + 2\,NADP^+ \rightleftharpoons G{-}S{-}S{-}G + 2\,NADPH + 2\,H^+$$

acest proces are loc mai ales în regnul vegetal, unde se admite că enzima face parte dintr-un complex multienzimatic, cu rol de transportor de hidrogen la oxigen.

5.4.1.5.2. *Flavinenzimele.* Aceste enzime catalizează transferul de hidrogen în unele reacţii de la substrat direct pe oxigen cu formare de peroxid de hidrogen :



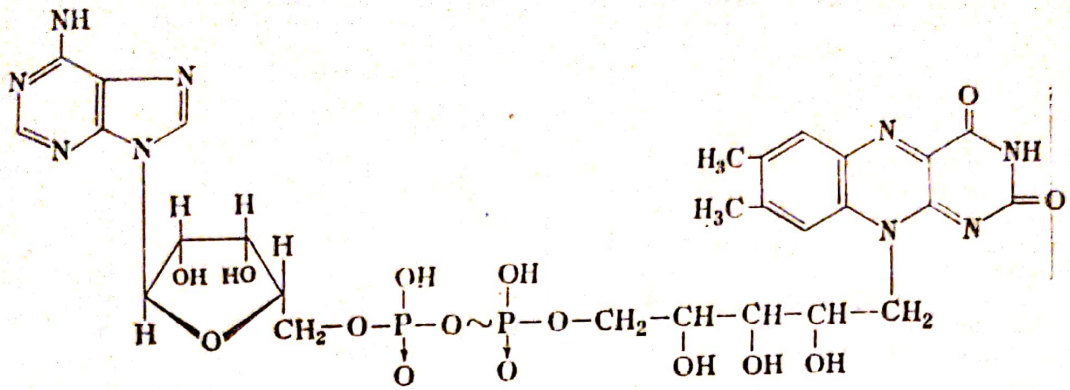
substrat redus — substrat oxidat

Tot din această categorie fac parte şi enzimele transportoare de hidrogen în condiţii anaerobe.

Din punct de vedere chimic flavinenzimele sînt formate prin condensarea a doi nucleotizi : unul adenilic, ca şi în cazul NAD^+ şi $NADP^+$, al doilea de asemenea „fals" deoarece, în locul unei baze purinice sau pirimidinice, conţine un nucleu flavinic, de fapt vitamina B_2. Deci sînt fla-

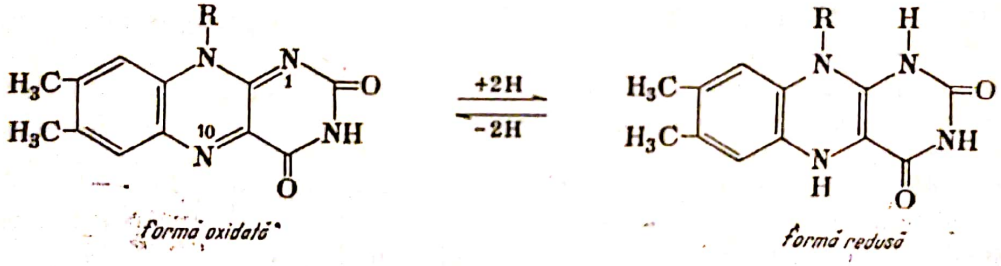
Scanned with OKEN Scanner

vinadenindinucleotide (FAD) :



Se cunosc și mononucleotide flavinice, cum este așa-numitul „ferment galben de oxidare" al lui W a r b u r g (FMN), constituit din riboflavin-5-fosfat.

Flavinnucleotidele îndeplinesc funcția de transportori de hidrogen ; fixarea hidrogenului se face la nivelul atomilor de azot din pozițiile **1** și **10** ale ciclului izoaloxazinic, în modul următor :

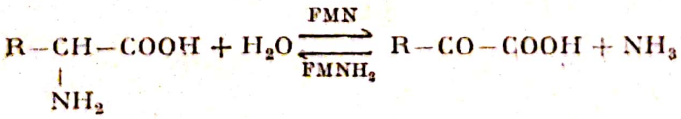


Unele flavinenzime (succindehidrogenaza, xantinoxidaza etc.) conțin în molecula lor Cu^{2+}, Fe^{3+} sau Mo^{6+}, ceea ce le conferă un rol dublu, fiind și transportoare de electroni.

Dintre flavinenzime se menționează cîteva mai importante :

— *glucozoxidaza*, care oxidează glucoza la acid gluconic, cu formare de H_2O_2, enzimă care se folosește pentru dozarea glucozei în mod specific ;

— *D-aminoacidoxidazele* realizează oxidarea formelor *D* ale aminoacizilor după reacția generală :



Partea proteică, respectiv flavoproteina din FMN și FAD, este specifică, ceea ce conferă o mare selectivitate catalitică acestei clase de enzime. În continuare sînt date și alte cîteva flavoproteine și reacțiile pe care le catalizează acestea (tab. 16).

Evident că numărul acestor enzime este mult mai mare, iar ionii metalici care intră ca activatori în structura lor sînt foarte numeroși. De exemplu, în cazul xantinoxidazei, care poate transfera hidrogen direct pe oxigenul molecular, proporția între FAD, Fe^{3+} și Mo^{6+} este de 4 : 1 : 0,7 ;

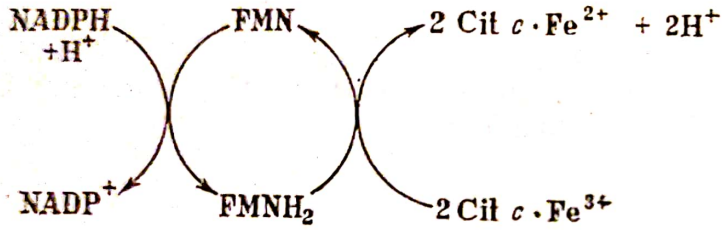
Scanned with OKEN Scanner

TABELUL 16

Cîteva flavinenzime şi reacţiile pe care le catalizează

Enzima	Sursa	Coenzima	Acceptorul fiziologic
D-aminoacidoxidaza	rinichi	FAD	O_2
L-aminoacidoxidaza	rinichi	FMN	O_2
L-aminoacidoxidaza	venin	FAD	O_2
Glicinoxidaza	rinichi	FAD	O_2
Xantinoxidaza	lapte	FAD	O_2 (cit.)
Aldehidoxidaza	ficat	FAD	NAD
NADPH-citocrom-*c*-reductaza	drojdie de bere	FMN	cit. *c*
NADH-citocrom-*c*-reductaza	inimă	Fe^{3+}	cit. *c*

—*citocrom-c-reductaza*, care are o specificitate similară cu NADH, a fost izolată din ficat, inimă şi drojdie şi lucrează sinergic cu piridinenzi-



ele:

FAD participă şi la oxidarea catalitică a acizilor graşi activaţi de CoA, formînd derivaţi nesaturaţi corespunzători de forma:

$$R-CH_2-CH_2-CO\sim SCo \underset{FADH_2}{\overset{FAD}{\rightleftharpoons}} R-CH=CH-CO\sim SCoA$$

Enzimele corespunzătoare au fost izolate din mitocondriile celulelor hepatice şi conţin FAD, culoarea lor variind de la galben spre verde. Enzimele de culoare verde conţin Cu^{2+} în proporţie de 2 : 1, faţă de 1 mol de FAD.

Amintim că şi molecula *luciferazei*, enzima care catalizează reacţia de oxidare a luciferinei cu eliberarea unei cuante luminoase conţine FAD. Sistemul luciferin-luciferază este utilizat pentru dozarea ATP în concentraţii foarte mici.

5.4.1.5.3. *Citocromii, catalazele şi peroxidazele.* Aceste enzime se mai numesc şi „hemoproteine", avînd toate comun hemul complexat cu o proteină.

Structura şi caracteristicile cîtorva din citocromii cel mai bine studiaţi au fost redate în capitolul de proteine (cromoproteine); o clasificare recentă a citocromilor este în funcţie de gruparea prostetică:

— *citocromi a* — în care gruparea prostetică, hemul, conţine radicalul formil;

— *citocromi b* — care conţin protohemul ca grupare prostetică;
— *citocromi c* — cu legături covalente realizate între hem şi proteină;
— *citocromi d* — cu dihidroporfirină (clorină) ca grup prostetic.

Altă clasificare utilizată este conform poziţiei bandei de absorbţie în soluţie alcalină de piridină: 580—590 nm pentru citocromii seriei *a*, 556—558 nm seria *b*, 549—551 nm seria *c* şi 600—620 nm seria *d*.

Date suplimentare referitoare la o serie de citocromi se află în tabelul 17.

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL 17

Principalii citocromi și caracteristicile lor

Sursa	Cit.	Banda (nm)	E_0(V)	Redus de	oxidat de
Mitocondrii	a	605	+0,28	cit. c	cit. a_3
Mitocondrii	a_3	600	+0,30	cit. a, c	O_2
Bacterii	a_1	590	—	cit. c	O_2
Bacterii	a_2	630	—	cit. b_1	O_2
Mitocondrii	b	563	+0,05	Enzime FAD	cit. c_1
Bacterii	b_1	560	—	—	cit. a_1, a_2
Drojdie de bere	b_2	557	—	Enzime FAD	cit. c
Microzomi	b_3	559	+0,04	—	—
Bacterii	b_4	554	—	Enzime FAD	cit. ?
Microzomi	b_5	555	+0,02	b_5-red. FAD	O_2
Cloroplaste	b_6	563	−0,06	—	cit. f
Mitocondrii	b_7	560	−0,03	cit. b	O_2
Mitocondrii	c	550	+0,26	cit. c_1	cit. a, a_3
Mitocondrii	c_1	553	+0,23	cit. b	cit. c
Bacterii	c_2	550	+0,30	cit. b?	oxidaze
Bacterii sulfurice	c_3	553	−0,21	—	—
Bacterii azotate	c_4	551	+0,30	cit. b?	cit. a_1?
Bacterii azotate	c_5	555	+0,32	cit. b	cit. a_1
Cloroplaste	f	555	+0,37	cit. b_6	O_2

Catalazele și *peroxidazele* sînt sisteme enzimatice care conțin ca grupare activă porfirine și catalizează reacțiile de descompunere a peroxidului de hidrogen și a altor peroxizi, care apar în organism în mod normal sau accidental (sub influența radiațiilor ionizate) în cantități mari.

Aceste enzime se găsesc în toate celulele animale și vegetale. Cantități mari au fost găsite la șobolan, după iradiere cu LD_{50}, activitatea crescînd cu pînă la 50% în ordinea: ficat, rinichi, splină, inimă și creier. Avînd cea mai mare viteză de reacție dintre toate enzimele cîte se cunosc pînă acum, și anume de $5 \cdot 10^6$ mol/mol enzimă·min, acționează după reacția globală de tipul:

$$AH_2 + H_2O_2 \rightarrow A + 2H_2O$$

În privința mecanismului de acțiune se pare că există oarecare abateri față de teoria clasică a lui M i c h a e l i s. Ținînd seama că fierul este legat atît de nucleul porfirinic, cît și de proteină, s-a propus următorul mecanism:

$$\text{Complex } Fe^{3+}(H_2O) + H_2O_2 \rightarrow \text{Complex } Fe^{3+}O + 2\,H_2O$$
$$\text{Complex } Fe^{3+}O + AH_2 \rightarrow \text{Complex } Fe^{2+}O + AH^- + H^+$$
$$\text{Complex } Fe^{2+}O + AH^- + H^+ \rightarrow \text{Complex } Fe^{3+}(H_2O) + A_{ox}$$

Asemănător acțiunii asupra peroxidului de hidrogen, acționează și asupra altor peroxizi, de exemplu asupra metilhidroperoxidului, pe care îl descompune pînă la H_2O_2 și radical metil. Existența peroxidazelor și catalazelor în hematii și leucocite dovedește rolul pe care îl au aceste enzime în mecanismul de autoapărare a organismului față de substanțele toxice care rezultă din metabolism, cum este H_2O_2.

Apariția peroxizilor și hidroperoxizilor în organismul animal este însoțită de o serie de tulburări care afectează, în primul rînd, procesele de biocataliză, prin radicalii liberi care apar în urma descompunerii peroxidice. Cercetînd aceste aspecte, C ă p â l n ă a arătat că electronazele de tipul citocromului *c* sînt inactivate în proporție de 50% de 3,2 μM de

LAHPO urmînd în ordine ca sensibilitate, enzimele: ascorbicoxidaza, glutaratoxidaza, glucozoxidaza, aminoacidoxidazele, seria continuîndu-se cu unele hidrolaze.

Pentru descompunerea peroxizilor sau hidroperoxizilor, catalazele şi peroxidazele acţionează instantaneu, după un mecanism de reacţie asemănător. Viteza de reacţie este direct proporţională cu concentraţia de peroxid format în sistem, atît timp cît nu este afectată partea proteică sau prostetică a enzimei.

În cazul inhibării citocromului *c* din mitocondrii cu LAHPO, s-a constatat că partea proteică este denaturată ireversibil la concentraţii foarte mici de LAHPO. Această inhibare atrage blocarea lanţului respirator la acest nivel, cu imposibilitatea trecerii electronului de la citocromul *c* la citocromul *a*. Intervenţia citocromului *c* în lanţul respirator este astfel blocată de peroxizii care se află în sistem.

Apariţia peroxizilor în timpul proceselor redox, cum este oxidarea CH_3-CH_2-OH, duce la reacţii care pot bloca lanţul respirator.

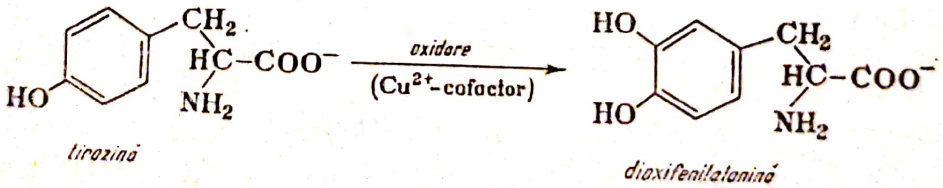
În acest fel apare justificată una din ipotezele cu privire la mecanismul de acţiune indirectă a radiaţiilor ionizante. Energia însemnată transportată de radiaţii în cursul iradierii organismelor vii duce la formarea unor cantităţi mari de peroxizi şi hidroperoxizi, care numai în mică măsură pot fi descompuşi de catalaze şi peroxidaze, iar cea mai mare parte vor afecta însuşi sistemul lor catalitic de descompunere.

Din cele relatate pînă acum reiese rolul pe care îl au sistemele enzimatice cu grupare prostetică protoporfirinică de tipul citocromilor, catalazelor şi peroxidazelor în oxidoreducerea celulară.

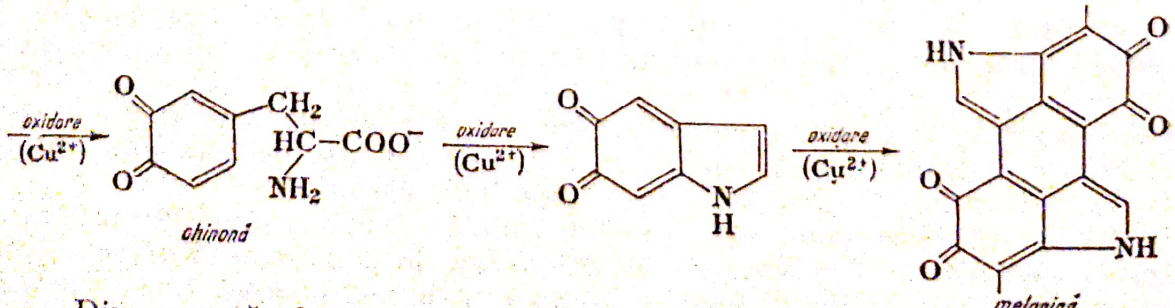
5.4.1.5.4. *Cuproproteinenzimele* (*cuproenzimele*). Acestea sînt sisteme enzimatice care conţin în molecula lor Cu^{2+}. Dintre ele fac parte *fenoloxidazele* şi *polifenoloxidazele*.

La unele din aceste enzime ionul metalic este legat de porfirine ca şi în cazul hemocianinelor, toate cuproenzimele utilizînd ca acceptor de electroni numai O_2.

Tirozinaza este o cuproenzimă care catalizează oxidarea tirozinei pînă la melanine, după următoarele reacţii:



tirozină — dioxifenilalanină



chinonă — melonină

Din această clasă mai fac parte: *ascorbicoxidaza*, *lacaza*, *uricaza*, *citocromoxidaza* şi altele.

Scanned with OKEN Scanner

Enzimele din această clasă catalizează reacţii de transfer, prin care o parte din molecula unui substrat numit donor este cedată unui alt substrat, numit acceptor. Se consideră că, în acest caz, energia de legătură a grupării care se transferă este conservată.

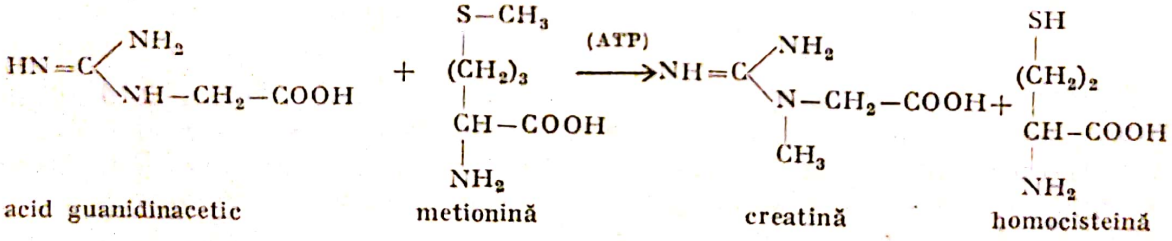
Mecanismul general al reacţiilor catalizate de aceste enzime este de forma :

$$R-A + R'-B \rightleftharpoons R-B + R'-A$$

În aceste reacţii se formează intermediar un complex enzimă-grupare transferabilă, complex care va reacţiona ulterior cu acceptorul, fixînd pe acesta gruparea transferată.

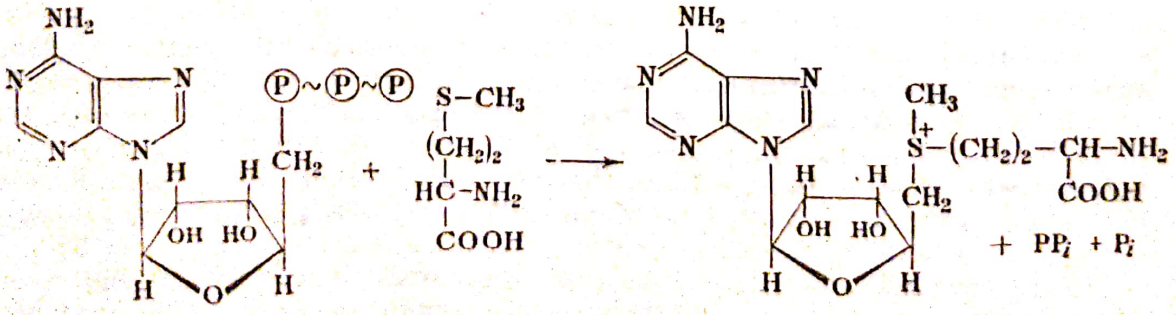
5.4.2.1. *Metiltransferazele* sînt enzime care catalizează transferul grupării metil de pe donor pe acceptor. Înainte de cedare gruparea metil trebuie activată de substanţe macroergice de tip ATP, formîndu-se o combinaţie intermediară, reactivă.

Procesul de transmetilare a fost descoperit de Du Vigneaud (1939), iar Brossok-Dudnoff (1947), lucrînd pe omogenat de ficat, arată mecanismul de metilare a colinei. Aceste enzime se găsesc în ficat, rinichi, muşchi şi creier. Unul dintre principalii donori de metil este metionina, care în cursul metabolismului intermediar furnizează grupări metil diferitelor substanţe, de exemplu colaminei, trecînd-o în colină, acidului guanidinacetic cu formare de creatină etc. :



acid guanidinacetic — metionină — creatină — homocisteină

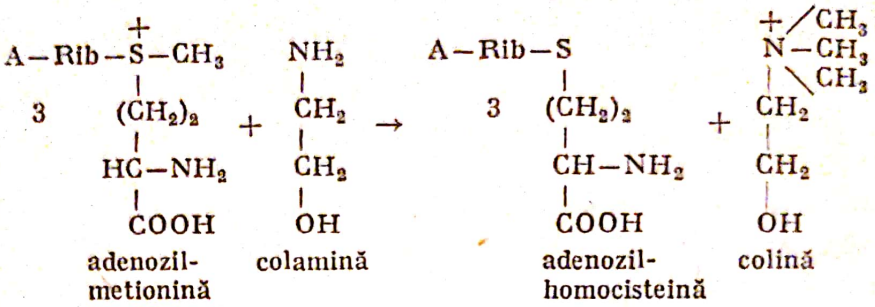
Activarea metioninei de către ATP se face prin legarea ei la restul de adenozil sub forma unui compus de sulfoniu, o stare mai reactivă, conform reacţiei :



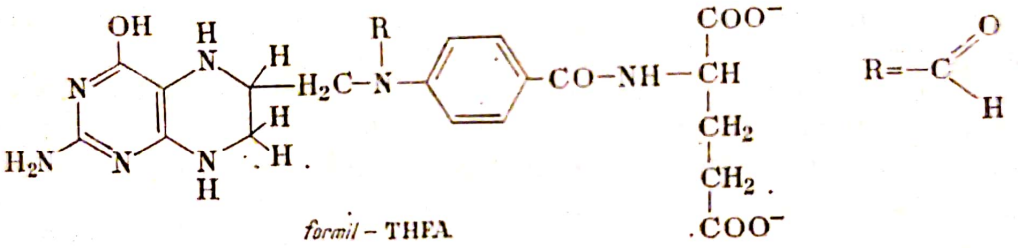
ATP — *metionină* — *S-adenozilmetionină (metil activ)*

Gruparea metil legată sub această formă este activă și poate fi cedată ușor atomului de azot; după cedare, ionul de sulfoniu trece la forma normală de adenozintioeter.

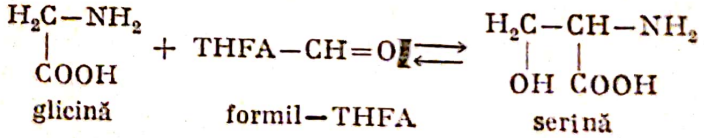
Transferul metilului se face numai pe un atom de azot, care fixează această grupare la cei doi electroni neparticipanți:



5.4.2.2. *Formiltransferazele* participă la transferul grupării —C(=O)H (formil), deseori folosită în biosinteza unor compuși importanți cum sint acizii aminați, bazele purinice și alte substanțe din organismul animal. Formiltransferazele au la bază THFA:



THFA este un compus autooxidabil, fiind convertit rapid la dihidrofolat, de către oxigenul molecular. De asemenea, este oxidat de NAD^+ printr-un mecanism redox la care participă și acidul ascorbic. Biosinteza serinei se face de la glicină, prin transferul unui atom de carbon activ, proces catalizat de o formiltransferază:



Sinteza bazelor purinice reclamă, de asemenea, intervenția acestor sisteme enzimatice în mai multe etape, pentru formarea nucleului purinic.

5.4.2.3. *Aciltransferazele* au fost identificate în urma constatării lui Nachmansohn, Lipmann și Mikado (1943), că acetilarea colinei este favorizată, pe lîngă intervenția ATP, și de o enzimă care activează acetatul, unindu-l rapid cu colina și ducînd la formarea acetilcolinei.

Lipmann denumește enzima care catalizează acest proces *coenzima de acetilare* (*CoA*); aceasta, combinîndu-se cu acetatul cu participarea ATP, formează acetatul activ, care ulterior va fi legat pe diferite substanțe de interes biologic, cum este de exemplu colina.

Scanned with OKEN Scanner

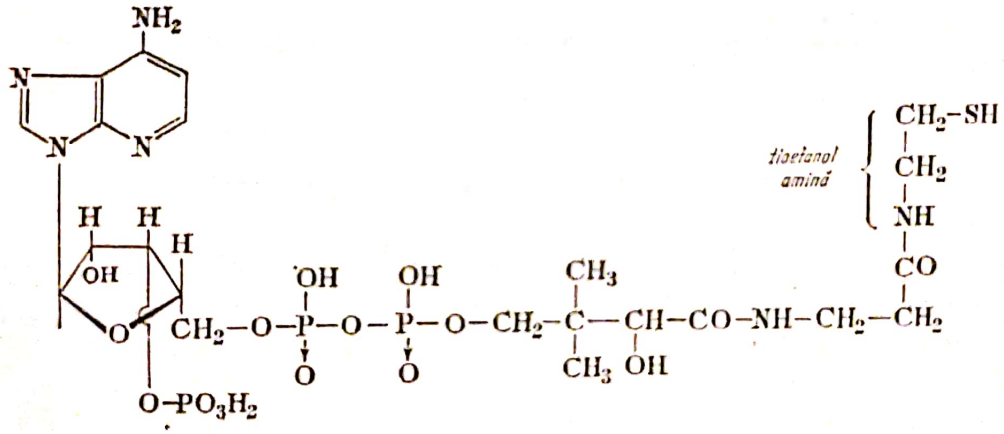
Structura CoA a fost stabilită datorită lucrărilor lui Lipmann și Lynen. Lynen (1951), printr-o serie de lucrări efectuate atît *in vitro* cît și *in vivo*, arată că în centrul activ al enzimei de acetilare există o grupare —SH, esențială pentru formarea „acetatului activ".

Acetiltransferazele catalizează reacțiile de transfer, avînd ca grupare prostetică CoA. Coenzima A transferă grupările acil ale acizilor organici, cu o variație de energie liberă de $\Delta G^\circ = 8{,}2$ kcal/mol.

Din punct de vedere chimic, CoA este formată din: adenozin-3′, 5′-difosfat, acid pantotenic și tioetanolamină (cisteamină).

Biosinteza coenzimei acetilante a fost lămurită de Novelli și colab., care au arătat etapele de formare, plecînd de la acidul pantotenic: în prima etapă acidul pantotenic se condensează cu cisteina, în prezența ATP ca donator de energie și formează pantotenilcisteina, apoi urmează decarboxilarea pantotenilcisteinei cu formarea pantoteinei; sub acțiunea unei kinaze, ATP fosforilează pantoteina în poziția 4 formînd 4-fosfopantoteina, care se condensează cu ATP și formează defosfo-CoA și pirofosfat. În prezența unei noi molecule de ATP, defosfo-CoA se fosforilează în poziția 3, sub acțiunea unei CoA-kinaze și se formează CoA.

Sinteza acestei coenzime necesită un consum de patru moli ATP care intervin pentru legarea diferiților radicali între ei.



coenzima acetilantă (CoA-SH)

Mecanismul de acțiune a CoA—SH implică gruparea tiolică, partea activă a acestei coenzime, care participă la reacții importante, și anume: reacții de acilare, prin care gruparea acil este transferată pe alte substanțe active, reacția de condensare a acetilului, prin care gruparea metil se leagă de gruparea carbonil, cu formarea unui carbinol (sinteza citratului, malatului, β-hidroxi-β-metilglutaratului, acetoacetatului și a acidului δ-aminolevulinic) și reacții de condensare esterică.

Printre multiplele roluri pe care le are în metabolismul intermediar, enzima acetilantă participă și la formarea acetatului activ, fragment de doi atomi de carbon, care intervine direct în procesele de acetilare.

CoA participă, de asemenea, la sinteza mediatorului chimic acetilcolină, prin acetilarea colinei și intervine în biogeneza nucleului ciclopentanoperhidrofenantrenic, care stă la baza colesterolului, a hormonilor sexuali, corticosuprarenali etc.

Scanned with OKEN Scanner

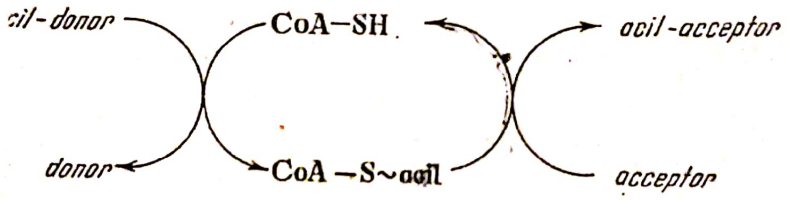
Marea sa importanţă metabolică explică şi răspîndirea pe care o are această coenzimă în organism, aşa cum reiese din tabelul 18.

TABELUL 18

Concentraţia CoA în diferite ţesuturi animale (unităţi de CoA/g ţesut proaspăt)

Ţesutul	Iepure	Şobolan	Porumbel	Om
Ficat	112	132	105	—
Suprarenală	65	91	—	—
Corticala suprarenală	—	79	—	—
Rinichi	50	74	—	—
Scoarţă cerebrală	40	20	40	—
Inimă	26	42	45	—
Testicul	26	—	—	—
Eritrocite	—	—	—	3—5

În reacţiile cu transfer de grupări acetil CoA funcţionează datorită legăturii care se stabileşte între gruparea tiolică şi radicalul acetil :



Legătura mercaptoacetil este puternic exergonică ($\Delta G^\circ = -10$ kcal/mol), fapt care explică denumirea de „acetat activ". Această legătură induce eliberarea unui proton de pe metil, care este mai reactiv în momentul legării sale la carboxil :

$$CoA-S\sim CO-CH_3 \rightleftharpoons \underset{\text{enoil-CoA}}{CoA-S-CO-CH_2^-} + H^+$$

În cazul activării acetatului, reacţia fiind reversibilă, constanta de activare va fi :

$$K = \frac{[\text{Acetil}\sim\text{CoA}]\cdot[\text{AMP}]\cdot[\text{P}-\text{P}]}{[\text{CoA}]\cdot[\text{ATP}]\cdot[\text{Acetat}]} = 2{,}7$$

Legarea acetatului de CoA necesită un donor de energie care este ATP :

$$CH_3-COOH + ATP + CoASH \rightleftharpoons CoAS\sim CO-CH_3 + AMP + PP$$

reacţie care la rîndul său este catalizată de o enzimă specifică.

Unele experienţe au pus în evidenţă în creier un produs intermediar fosforilat al coenzimei acetilante de forma CoA-S-Ⓟ, care s-ar forma prin

reacţia între CoA şi ATP şi care ar reacţiona ulterior cu acetatul, activîndu-l :

$$CoA-SH + ATP \rightleftharpoons CoA-S-\textcircled{P} + ADP$$

$$CoA-S-\textcircled{P} + \underset{\underset{CH_3}{|}}{COOH} \rightleftharpoons CoA-S-CO-CH_3 + P_i$$

reacţie care s-ar afla sub dependenţa unei fosfokinaze.

Unul dintre cei mai importanţi formatori de grupări acetil este acidul piruvic, care, în cea mai mare parte, provine din glucoză şi în mai mică măsură rezultă din unii aminoacizi. Înainte de a ajunge la acetatul propriu-zis, acidul piruvic suferă o decarboxilare oxidativă sub acţiunea unui complex enzimatic, la care, în afară de CoA, mai participă NAD^+, TPP şi acidul lipoic :

$$\text{acid piruvic} \xrightarrow[NAD^+]{\text{TPP; acid lipoic}} \text{acetil-SCoA} + NADH + H^+ + CO_2$$

O serie de substanţe, de exemplu colina, sînt acceptori de grupări acetil ; fenomenul se numeşte transacetilare şi are loc sub acţiunea enzimelor specifice numite transacetilaze :

$$CoA-S-CO-CH_3 + \underset{\text{colină}}{HO-CH_2-CH_2-N^+(CH_3)_3} \xrightarrow{\text{colinacetilază}}$$

$$\longrightarrow CoA-SH + \underset{\text{acetilcolină}}{H_3C-CO-O-CH_2-CH_2-N^+(CH_3)_3}$$

Colinacetilaza se găseşte în creier, muşchi, nervii perifer ici, placentă etc şi este activată de ionii de K^+, Rb^+, Mg^{2+} şi inhibată de Cu^{2+}.

Rolul acetatului activ în metabolismul intermediar reiese din figura 31.

5.4.2.4. *Aciltransacilazele* catalizează reacţiile în care CoA formează combinaţii active şi cu alţi acizi decît cu acidul acetic. Asemenea combinaţii se întîlnesc în biosinteza lipidelor, în sinteza acidului hipuric din acidul benzoic şi glicocol etc.

$$\underset{\text{benzoil-CoA}}{C_6H_5-CO\sim SCoA} + \underset{\text{glicină}}{H_2N-CH_2-COOH} \rightleftharpoons$$

$$\rightleftharpoons \underset{\text{acid hipuric}}{C_6H_5-CO-NH-CH_2-COOE} + CoA-SH$$

5.4.2.5. *Glicoziltransferazele* catalizează transferul unui rest de glucid pe un acceptor specific, ca în cazul biosintezei polizaharidelor.

Formarea polizaharidelor, atît în regnul vegetal cît şi în cel animal, implică o serie de reacţii endergonice, în care esterul glucozo-1-fosforic este policondensat la macromolecule. Energia necesară policondensării este furnizată de UTP şi ATP, care, prin hidroliză, eliberează o energie

Scanned with OKEN Scanner

de $\Delta G^\circ = -7{,}3$ kcal/mol. De exemplu, biosinteza unui dimer cum este zaharoza are loc prin reacţia între compuşii activaţi :

UDP-glucoză + F-6-P ⇌ zaharoză-6-P + UDP

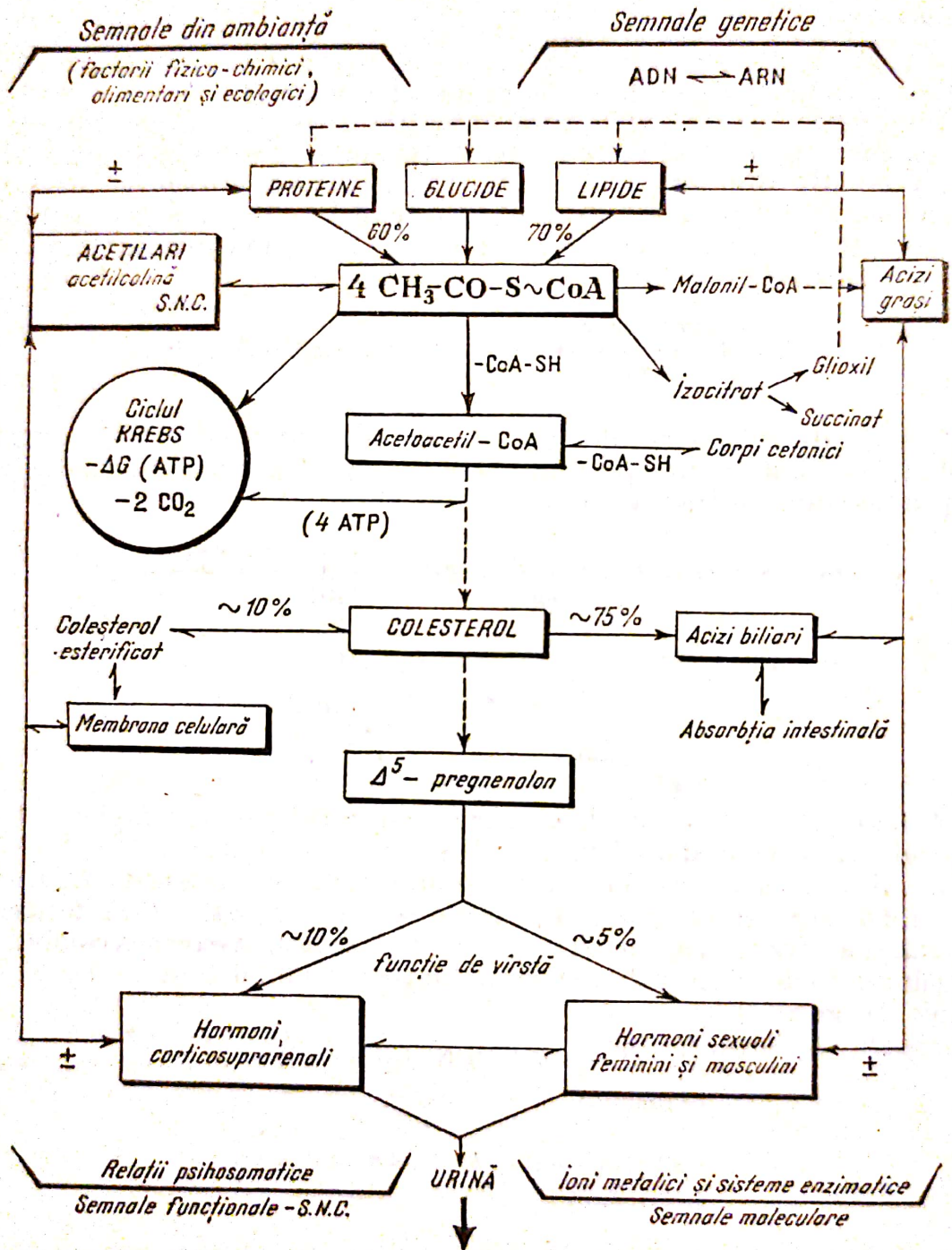


Fig. 31. Corelaţii moleculare şi modulări energetico-funcţionale ale acetil-CoA.

Echilibrul de reacţie va fi deplasat de la dreapta spre stînga, în funcţie de *p*H-ul mediului în care are loc procesul. Constanta de echilibru în condiţii optime

$$K = \frac{[\text{zaharoză}]}{[\text{G-1-P}]\cdot[\text{fructoză}]} = 5\cdot 10^{-2}$$

Scanned with OKEN Scanner

Sărurile metalelor grele, nitraţii şi sulfiţii, tirozina şi alanina inhibă enzimele din această clasă.

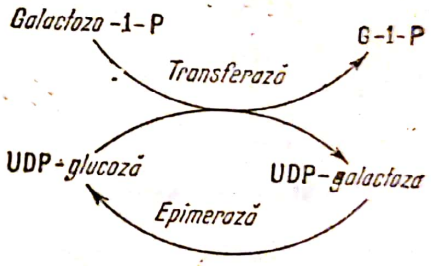
În ceea ce priveşte biosinteza polizaharidelor, ea se produce printr-un şir de reacţii la care participă complexe enzimatice specifice alături de donori de energie ca ATP, GTP, CTP. Schematic, sinteza polizaharidelor urmează cîteva etape mai importante : sinteza esterilor-1-fosforici ; modificarea donorilor stereospecifici în funcţie de polizaharidul care se formează ; reacţia de transfer ; rearanjamentul în macromolecula polizaharidului.

Revenind la biosinteza zaharozei, reacţia de activare are loc după schema :

$$\text{G-1-P} + \text{UTP} \rightleftharpoons \text{UDP-glucoză} + \text{PP}_i$$

De menţionat că pentru această reacţie simplă sînt necesare circa douăzeci de sisteme enzimatice, care catalizează diferite etape de reacţie.

În cataliza reacţiilor din etapa a doua intervin alte sisteme enzimatice, care au scopul de a favoriza rearanjarea intramoleculară a monomerilor pentru formarea polimerilor din etapele următoare. Dacă se ia ca exemplu echilibrul realizat între glucoză şi galactoză, în vederea metabolizării galactozei, care are atît intricaţii metabolice, cît şi unele aspecte ereditare, interdependenţa celor două oze se poate schematiza astfel :



Biosinteza glicogenului se realizează după mecanisme de reacţie asemănătoare, din care unele vor cataliza formarea legăturii α-glucozido-1,4, iar altele vor fi glicoziltransferaze, numite şi enzime de ramificare (branching enzymes). Acestea catalizează transferul resturilor glicozil de pe lanţurile cu legături 1—4 pe C_6 iniţiind ramificarea lanţurilor (amilo-1,4 → 1,6-transglicozidază) şi interferează cu enzimele care intervin atît în formarea amilopectinei, cît şi a glicogenului.

Biosinteza glicogenului este un proces complex din care se cunosc doar cîteva aspecte ; în afară de enzimele amintite, în acest mecanism mai intervin insulina, adrenalina, hormonii sexuali şi corticosuprarenali, în condiţii normale fiecare celulă avînd în compoziţia sa şi molecule de glicogen.

5.4.2.5. *Aminotransferazele* catalizează trecerea unei grupări amino de pe un α-aminoacid pe un cetoacid, cu formarea unui nou aminoacid :

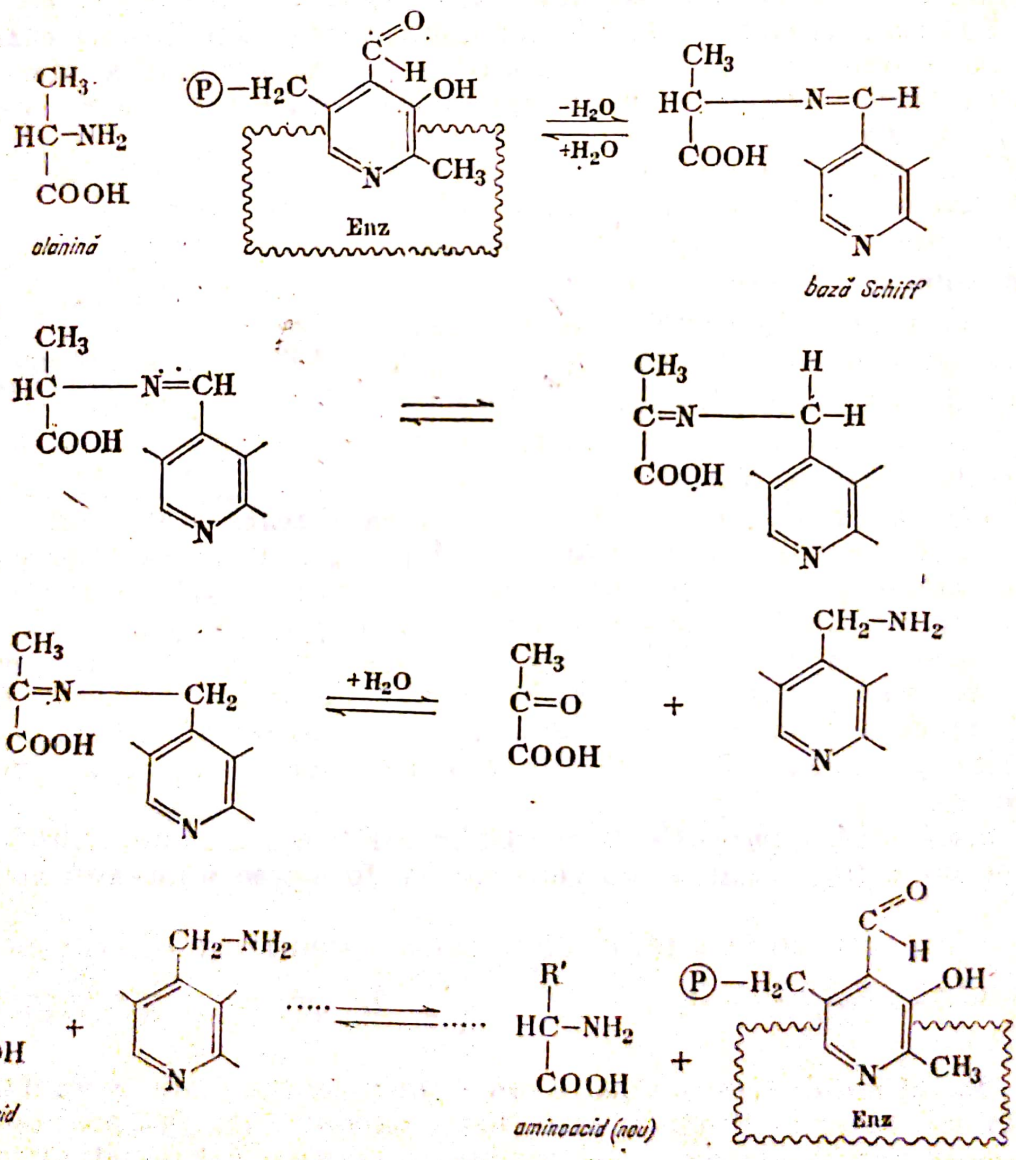
$$\text{R}-\underset{\displaystyle\text{NH}_2}{\underset{|}{\text{CH}}}-\text{COOH} + \text{R}'-\underset{\displaystyle\text{O}}{\underset{\|}{\text{C}}}-\text{COOH} \rightleftharpoons \text{R}-\underset{\displaystyle\text{O}}{\underset{\|}{\text{C}}}-\text{COOH} + \text{R}'-\underset{\displaystyle\text{NH}_2}{\underset{|}{\text{CH}}}-\text{COOH}$$

Reacţiile de transaminare au fost descoperite de Braunstein şi Kriţman (1937), în cazul următoarelor două sisteme : acid glutamic-acid piruvic şi acid glutamic-acid oxalacetic. Azi se admite că marea majoritate a aminoacizilor participă la procesele de transaminare, fenomen prin care organismele animale au posibilitatea de a-şi sintetiza acizii aminaţi proprii în funcţie de necesităţile metabolice.

Scanned with OKEN Scanner

Mecanismul transaminării constă în transferul grupării amino de pe aminoacid pe cetoacid sub acţiunea catalitică a enzimelor de transaminare care au drept parte prostetică piridoxalfosfatul. Acest transfer se face în mai multe etape, implicînd o serie de rearanjări intramoleculare, care în final duc la formarea unui nou aminoacid şi a unui nou cetoacid.

În prima fază se realizează o condensare între aminoacid şi gruparea activă a enzimei, cu formarea unui compus de tipul bazelor S c h i f f. Compusul format suferă o rearanjare intramoleculară prin deplasarea unui proton de la un carbon la altul, adică are loc tautomeria bazei S c h i f f. În faza a treia, în prezenţa apei, enzima preia funcţia amino pe care o va ceda unui cetoacid, prin acelaşi mecanism ca mai sus şi rezultă cetoacidul corespunzător aminoacidului iniţial. Acest transfer poartă denumirea de „mecanism de ping-pong" :



Activitatea transaminazelor este favorizată de unii ioni metalici, cu care enzima formează chelaţi, înlesnind astfel legătura enzimă-substrat ; s-a studiat influenţa activatoare a Cu^{2+} şi Fe^{3+}

Scanned with OKEN Scanner

Reacţiile de transaminare au o importanţă covîrşitoare în metabolismul intermediar. Cu ajutorul lor se pot sintetiza aminoacizii proprii organismului, utilizînd aminoacizii şi cetoacizii în exces, care se găsesc în aşa-numitul rezervor (*pool*) metabolic. Tot cu ajutorul acestor reacţii se stabileşte conexiunea între metabolismul proteic şi cel glucidic, prin intermediul cetoacizilor rezultaţi în ciclul K r e b s : acidul piruvic, acidul oxalacetic şi acidul α-cetoglutaric.

Cele mai cunoscute transaminaze, corespunzătoare diferitelor substraturi, sînt GPT şi GOT.

Alanintransaminaza este printre primele transaminaze cunoscute; catalizează reacţia reversibilă dintre acidul glutamic şi acidul piruvic, respectiv alanină şi acid α-cetoglutaric.

Transaminazele GOT şi *glutamoaspartică* sînt enzimele care catalizează reacţiile dintre acidul glutamic şi oxalacetic şi dintre acidul α-cetoglutaric şi aspartic. Ambele sînt răspîndite în ţesuturile animale şi vegetale, iar interacţiunea lor apare sub forma următoare :

acid glutamic + acid piruvic ⇌ acid α-cetoglutaric + alanină

acid aspartic + acid α-cetoglutaric ⇌ acid oxalacetic + acid glutamic

acid aspartic + acid piruvic ⇌ acid oxalacetic + alanină

Din această reacţie se vede că cel mai solicitat sistem de transaminare este acid aspartic — acid piruvic, care, probabil, este şi cel mai răspîndit în diferite organe.

Se mai cunosc şi alte sisteme de transaminare, care sînt redate în tabelul 19.

TABELUL 19

Reacţii de transaminare şi enzimele care le catalizează

Denumirea	Sursa	Reacţia
Acetilornitintransaminaza	Bacterii	N-acetil-*L*-ornitină + α-cetoglutarat ⇌ N-acetilglutamic-semialdehidă + *L*-glutamat.
D-aminoacidtransaminaza	Bacterii	*D*-aspartat + α-cetoglutarat⇌oxalacetat + *D*-glutamat
Glutamatcisteintransaminaza	Ficat	*L*-glutamat + mercaptopiruvat⇌ α-cetoglutarat + cisteină
Glutamatglicintransaminaza	Plante Animale Bacterii	*L*-glutamat + glioxalat⇌ α-cetoglutarat + glicină
Glutamatleucintransaminaza	Plante Animale Bacterii	*L*-glutamat + α-cetoizocaproat ⇌ α-cetoglutarat + *L*-leucină
Glutamattirozintransaminaza	Plante Animale Bacterii	*L*-glutamat + *p*-hidroxifenilpiruvat ⇌ α-cetoglutarat + *L*-tirozină

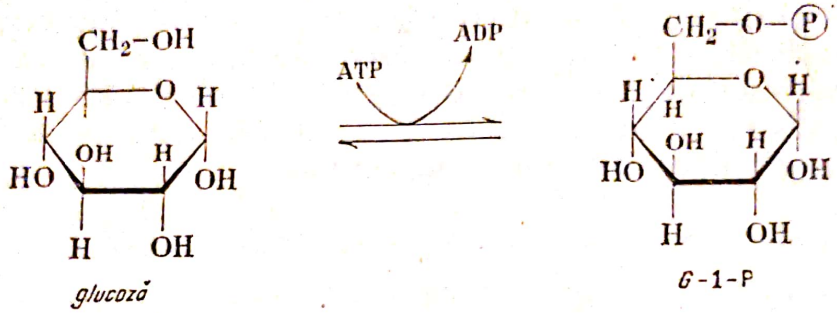
5.4.2.6. *Fosfotransferazele* catalizează transferul de grupări fosfat. L i e b i g (1863) este primul care atrage atenţia asupra importanţei majore pe care o are fosforul pentru animale şi plante.

Scanned with OKEN Scanner

Compușii fosforilați participă totdeauna la schimbări energetice importante; energia care rezultă din reacțiile oxidative exergonice este folosită în mare măsură pentru sinteza compușilor organici fosforilați pe seama fosfatului anorganic (reacție endergonică).

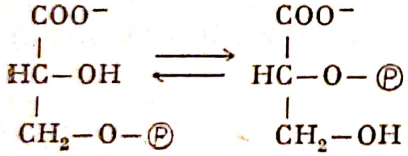
Ulterior, acești compuși organici fosforilați se folosesc în reacțiile de sinteză intracelulară, ei furnizînd energia liberă pentru reacțiile endergonice.

Dintre cele mai importante reacții cu transfer de fosfat, în funcție de substratul asupra căruia acționează, amintim *glicozilfosfotransferazele* (*glucokinazele*) care intervin în fosforilarea glucidelor, după reacția :



glucoză — *G-1-P*

Fosfotransferaza pseudointramoleculară catalizează reacția de transfer a moleculei de fosfat de la carbonul **3** la carbonul **2** și lucrează împreună cu izomeraza corespunzătoare, conform reacției :



Cea mai frecventă reacție de transfer de fosfat cu participarea ATP este considerată reacția în care ATP pierde o moleculă de acid fosforic și trece în ADP. În acest caz intervin și elementele apei, schimbul de energie liberă fiind de 7,3 kcal/mol.

Dacă compușii rezultați sînt macroergici, atunci reacția este reversibilă; în caz contrar, echilibrul este deplasat, preponderent de la stînga spre dreapta.

Cele patru tipuri de reacții cu transfer de fosfat pot fi redate după schema :

a) $ATP + ROH \rightleftharpoons R-O-P + ADP$

b) $ATP + ROH \rightleftharpoons R-O-P\sim P + AMP$

c) $ATP + R-COOH \rightleftharpoons R-CO-AMP + PP_i$

d) $ATP + R-S-CH_3 \rightleftharpoons R-\overset{+}{\underset{\displaystyle CH_3}{S}}-Riboză-Adenină + PP_i + P_i$

Reacția b), cu transfer de pirofosfat, este mai rară decît reacția a). Un exemplu îl constituie transformarea ribozo-**5**-fosfatului în **5**-fosforibozo-**1**-pirofosfat.

Transferarea AMP pe acceptor, cu punerea în libertate de pirofosfat (reacția c)), este destul de frecventă; rezultă un compus activ, cu un potențial energetic ridicat, ca de exemplu în cazul activării aminoacizilor pentru sinteza proteinelor sau în cazul activării acizilor grași în vederea degradării.

Scanned with OKEN Scanner

S-a constatat că energia de respingere electrostatică între grupările electronegative din pirofosfat este de 5 kcal/mol. Din acest considerent ea devine utilizabilă pentru diferite reacţii în care pirofosfataza scindează pirofosfatul cu eliberare de energie. O astfel de reacţie de cuplare energetică o constituie formarea sulfatului activ, care are loc după schema:

1. $A-Rib-\textcircled{P}-\textcircled{P}-\textcircled{P}+H_2SO_4 \rightleftharpoons A-Rib-\textcircled{P}-SO_3H + PP_i$;
2. $PP_i \rightarrow P_i + P_i$;
3. $A-Rib-\textcircled{P}-SO_3H + HOH \rightleftharpoons A-Rib-\textcircled{P}+H_2SO_4$;

1. $\Delta G^\circ = +11$ kcal/mol;
2. $\Delta G^\circ = -5$ kcal/mol;
3. $\Delta G^\circ = -6$ kcal/mol;

$\Delta G^\circ = 0$ kcal/mol

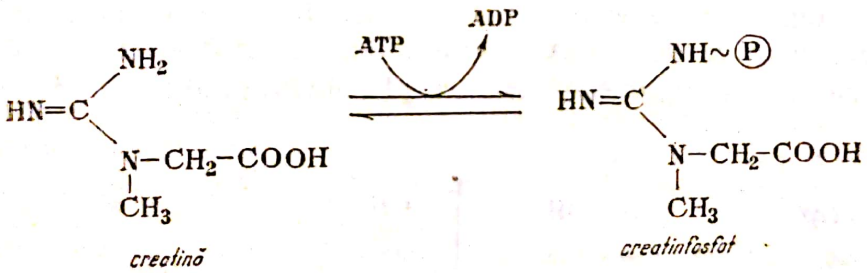
Adenozilfosforilsulfatul, care se formează după reacţia de mai sus, apare în soluţie într-o cantitate foarte mică.

Dintre transfosfataze, cele mai importante sînt *hexokinazele*, care catalizează reacţiile de fosforilare a glucidelor, de exemplu:

ATP + α-*D*-glucoză ⇌ ADP + α-*D*-glucozo-6-P

Piruvatkinaza trece fosforul de pe acidul fosfoenolpiruvic pe ADP cu formare de ATP.

Creatinkinaza participă la transferul grupării fosfat de pe ATP pe creatină cu formare de creatinfosfat şi ADP:



Argininkinaza îndeplineşte rolul de fosforilare a argininei; la nevertebrate argininfosfatul este un donor de energie.

Tiaminkinaza şi *flavinkinaza* favorizează fosforilarea vitaminei B_1, respectiv a vitaminei B_2, care ulterior intră, sub această formă, în structura unor enzime. Pentru fosforilarea vitaminei B_6 există *piridoxalkinaza*.

Transferul de fosfat intervine în sinteza proteinelor, a lipidelor şi a glucidelor, prin formarea diferiţilor compuşi cu rol important în reacţiile metabolice.

5.4.3. HIDROLAZELE

Clasa hidrolazelor cuprinde enzimele care hidrolizează substratul prin intermediul elementelor apei. Din această clasă fac parte enzimele care hidrolizează proteinele pînă la aminoacizi, polizaharidele pînă la monozaharide şi lipidele pînă la acizi graşi şi glicerină.

Scanned with OKEN Scanner

Variația energiei libere în cursul acestor reacții este mică, de ordinul 0,5—4 kcal/mol, avînd importanță numai în termoreglarea organismului;

$$R-R' + HOH \rightleftharpoons R-H + R'-OH$$

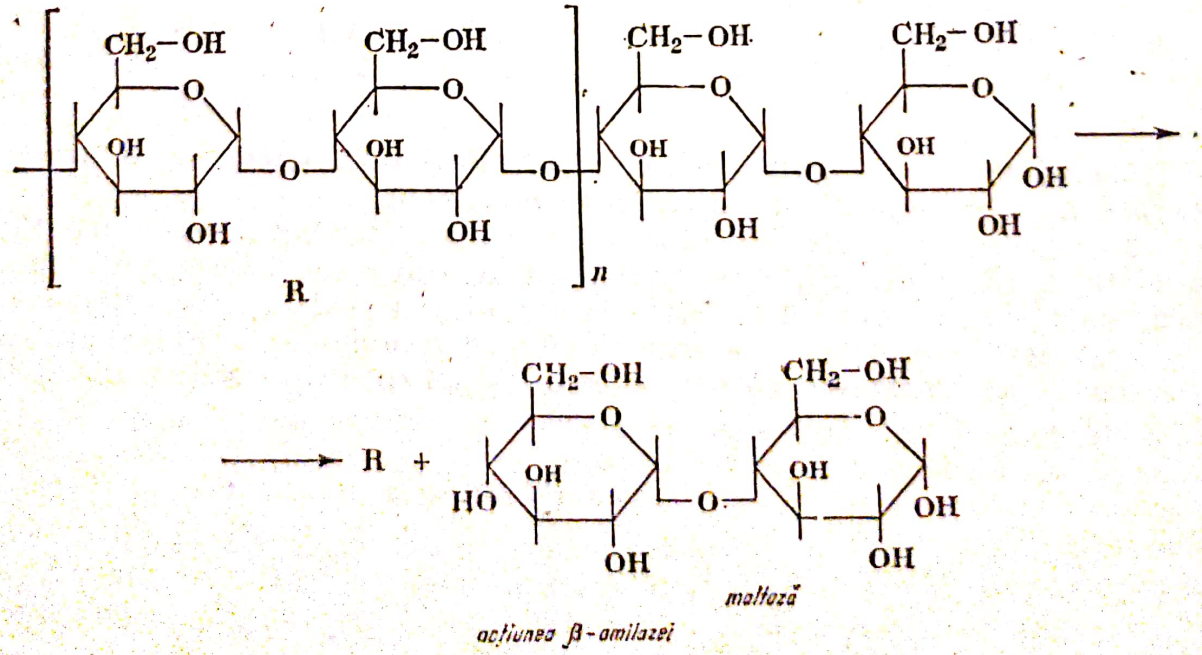
5.4.3.1. *Glicozidhidrolazele* (*amilazele*) sînt enzime care participă la reacția de hidroliză a amidonului și a glicogenului, pînă la stadiul de monozaharide și dizaharide.

Se găsesc răspîndite în regnul vegetal, în semințele cerealelor și în regnul animal, de unde pot fi extrase cu ușurință. În perioada maturației semințelor se constată mari variații ale activității amilazei, fosfatazelor și proteazelor.

În organismul animal se găsesc *amilaze* în salivă, în mușchi, în ficat și în sînge, care, probabil, este de origine pancreatică, deoarece în pancreatita acută sau în necroza pancreasului se constată o creștere a amilazei sanguine și apariția ei în urină.

Cu ajutorul cromatografiei s-au pus în evidență două amilaze: α-amilaza, care are o activitate de 73% asupra izoamilozei (amilopectina), degradînd-o pînă la dextrine, și β-amilaza, care degradează direct amiloza pînă la faza de α-maltoză, fără a trece prin stadiul intermediar de dextrine. Această amilază are o activitate de 60% asupra izoamilozei, acționînd numai asupra catenelor laterale. β-amilaza este răspîndită mai ales în regnul vegetal, iar α-amilaza în regnul animal.

Ionii de Cl^- și Ca^{2+} sînt activatori ai α-amilazei. În special clorul este indispensabil pentru activitatea enzimei. Metalele grele inhibă acțiunea acestor enzime, mai puternic a β-amilazei, fapt ce denotă o structură care conține grupări tiolice. Activitatea lor în funcție de *p*H este dependentă de origine; amilaza salivară are *p*H optim 6, amilaza din intestin 7 etc.



acțiunea β-amilazei

Celulazele degradează macromolecula de celuloză pînă la substanțe simple. Ele se găsesc la unele bacterii, insecte (molii) și la termite. La animalele superioare nu s-a putut evidenția acțiunea celulazei, cantitatea de celuloză care se degradează în intestin la ierbivore avînd loc în mod indirect, sub acțiunea bacteriilor intestinale.

Hialuronidazele acționează asupra acidului hialuronic, producînd depolimerizarea acestuia pînă la unitățile structurale simple, respectiv acidul glucuronic și glucozamina.

Acidul hialuronic face parte din țesutul conjunctiv al oganismului, fiind componenta importantă a substanței fundamentale. Enzima de degradare a acestuia a fost pusă în evidență de D u r a n (1928) și numită „factor de difuziune". Hialuronidaza se găsește la numeroase bacterii, în veninul insectelor și șerpilor și în testiculele animalelor superioare.

Prezența în plasmă a unor inhibitori ai activității hialuronidazei ar avea un rol în împiedicarea pătrunderii bacteriilor și a toxinelor. Acești inhibitori se numesc antiinvazine.

Sistemul acid hialuronic-hialuronidază are importanță în metabolismul țesutului conjunctiv, precum și în patologia acestuia.

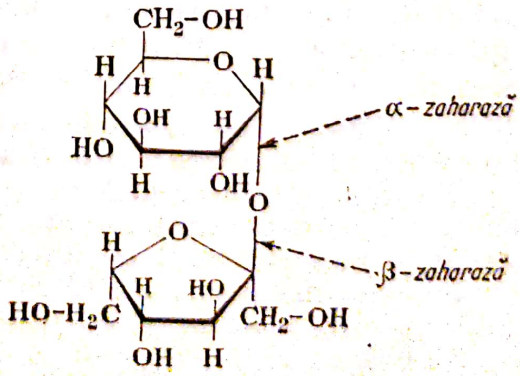
Oligoglucidazele sau *oligazele* sînt enzime care desfac hidrolitic di-, tri- și tetrazaharidele. Ele au o mare specificitate de acțiune, care se manifestă atît în raport cu anomeria carbonului glicozidic (formele α- și β-), cît și în raport cu forma furanozică sau piranozică a ciclului.

Maltaza este o α-glicozidază care catalizează desfacerea maltozei în două molecule de α-glucoză. În natură este destul de răspîndită, iar *p*H-ul optim de activitate este în funcție de origine : cea din mucoasa intestinală acționează la *p*H = 6,5, pe cîtă vreme cea din malț la *p*H = 4,5.

Zaharaza sau *invertaza* desface legătura β-fructofuranozică. Există o altă zaharază care poate cataliza desfacerea legăturii α-glicopiranozice. Cele două enzime care acționează asupra zaharozei se deosebesc între ele nu numai prin formele ciclice izomere asupra cărora acționează, ci și prin *p*H : α-zaharaza este activă la *p*H = 7, iar β-zaharaza la *p*H = 4,5. Activitatea acestor două enzime este un caz tipic de specificitate în raport cu izomeria inelului de legătură.

Cu toate că amîndouă catalizează desfacerea aceluiași substrat într-o moleculă de α-glucoză și una de β-fructoză, specificitatea este dată de forma izomerului ciclic :

Lactaza, enzimă care se găsește în sucul intestinal la mamifere, desface lactoza într-o moleculă de β-galactoză și una de α-glucoză. Datorită faptului că ea apare numai în prezența substratului, poate fi dată ca exemplu de sinteză de enzime adaptative.



β-glucozidazele desfac hidrolitic β-glucozizii.

β-glucuronidazele catalizează scindarea compușilor de conjugare a acidului glucuronic cu fenolii, hormonii steroizi etc. În cursul sarcinii s-a constatat o creștere a activității β-glucuronidazelor.

5.4.3.2. *Proteinazele* sau *peptidhidrolazele* sînt enzime care catalizează desfacerea proteinelor la peptide şi la aminoacizi. *Pepsina* este enzima care se găseşte în sucul gastric şi care favorizează desfacerea catalitică a proteinelor în fragmente mai mici şi în resturi de aminoacizi. Pepsina este secretată sub formă de *pepsinogen* în regiunea pilorică a stomacului, de către celulele fundice, celulele parietale secretînd acidul clorhidric.

Sub acţiunea HCl la pH = 1,5—2,5, pepsinogenul se transformă în pepsină activă, care, în continuare, favorizează în mod autocatalitic trecerea pepsinogenului în pepsină, după schema :

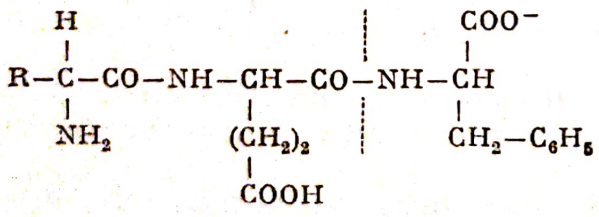
$$\text{pepsinogen} \xrightarrow{H^+} \text{pepsină}$$

$$\uparrow\_\_\_\_\_\downarrow$$

autocatalitic

Acţiunea de trecere a formei inactive de pepsină în formă activă se face prin îndepărtarea unui inhibitor de reacţie. Pepsinogenul are masa moleculară de 42 000, iar pepsina 34 000, ceea ce înseamnă că acest inhibitor este tot o componentă peptidică cu o masă de cca 8 000 şi care s-a constatat că este bogată în arginină. Cele două forme se deosebesc şi printr-unul din aminoacizii terminali şi anume : leucina în cazul pepsinogenului şi a inhibitorului şi izoleucina în cazul pepsinei. Pepsinogenul şi pepsina au, la celălalt capăt, acelaşi aminoacid şi anume alanina.

Pepsina cristalizată are un conţinut ridicat în aminoacizi cu caracter acid. Astfel, conţine 16 resturi de tirozină, două sau trei legături disulfurice şi o moleculă de acid fosforic. Se pare că există o legătură strînsă între activitatea enzimatică şi conţinutul în aminoacizi cu nucleu aromatic. Acţiunea pepsinei se exercită asupra legăturilor polipeptidice formate între un aminoacid aromatic şi unul dicarboxilic :



În cazul existenţei unei grupări aminice libere, în apropierea legăturii polipeptidice, pepsina nu mai exercită nici o activitate catalitică. Enzima nu are nici o acţiune în cazul aminoacizilor de formă *D*, ci numai asupra seriei naturale *L*. Degradarea proteinelor pînă la stadiul de oligopeptide cu 5—10 aminoacizi se face sub acţiunea pepsinei, după care urmează acţiunea enzimelor din pancreas, care continuă degradarea pînă la aminoacizi liberi. Pepsina desface în medie 10% din legăturile peptidice, iar polipeptidele rezultate au masa moleculară de 300—3 000, în funcţie de numărul aminoacizilor.

Tripsina este secretată de pancreasul exocrin în intestinul subţire sub formă de proenzimă numită *tripsinogen*. Tripsinogenul, sub acţiunea unei peptidaze secretată de intestin şi numită *enterokinază* (P a v l o v), se transformă în tripsină activă. Tripsina liberă acţionează alături de enterokinază pentru transformarea pepsinogenului în pepsină.

Activarea tripsinogenului se face prin ruperea unui hexapeptid, cu o structură în care predomină acidul aspartic, de forma : Val-$(Asp)_4$-

Lys. Această transformare a tripsinogenului în tripsină poate fi schematizată în modul următor (fig. 32) :

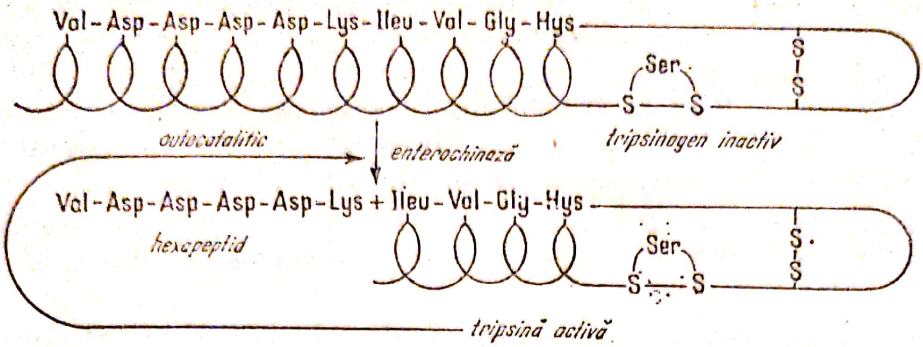


Fig. 32. Mecanismul activării tripsinei.

Prin ruperea celor şase aminoacizi din structura tripsinogenului, se creează posibilitatea acţiunii asupra proteinelor, probabil datorită forţelor noi electrostatice din centrul activ, dintre serină şi histidină.

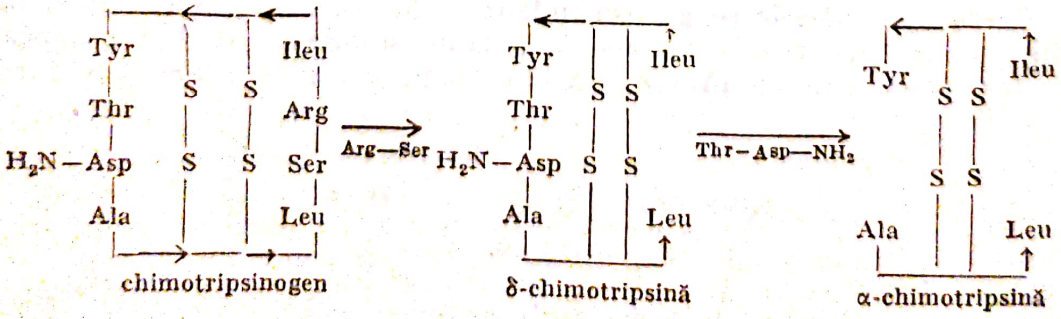
Tripsina cristalizată are masa moleculară 24 000, iar *p*H-ul optim de activitate este între 7 şi 9. Acţiunea ei se exercită asupra legăturilor polipeptidice formate cu participarea aminoacizilor lizină şi arginină. Interesant de semnalat este faptul că ea scindează şi amidele şi chiar esterii acestor aminoacizi.

Centrul activ al tripsinei conţine un rest de serină, alcătuit, se pare, în prima fază, dintr-un ester cu gruparea peptidică a argininei sau lizinei şi care, în faza a doua, s-ar scinda hidrolitic.

Acţiunea enzimei se exercită, aşa cum s-a mai spus, asupra polipeptidelor rezultate în urma acţiunii hidrolizante a pepsinei. Tripsina are o acţiune mai slabă asupra proteinelor native ca lactalbumina, ovalbumina, serumglobulina etc. Structura secundară intactă reprezintă o protecţie eficientă împotriva hidrolizei.

Chimotripsina este secretată împreună cu tripsina sub formă inactivă de *chimotripsinogen*. Activarea chimotripsinogenului pentru a trece în chimotripsină se face sub acţiunea tripsinei.

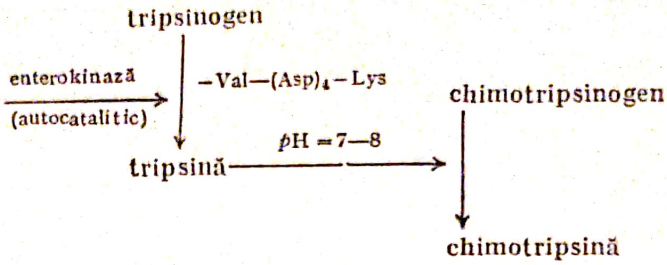
Această activare se face în mai multe etape intermediare. Într-o primă etapă se face scindarea în două a unui polipeptid ciclic, cu care prilej se elimină două dipeptide :



Centrul activ al chimotripsinei se aseamănă foarte mult cu cel al tripsinei, conţinînd un rest de serină cu acţiune catalitică, care reacţionează cu substanţele inhibitoare cum este diizopropilfluorfosfatul.

Scanned with OKEN Scanner

Cele două enzime sînt foarte asemănătoare, atît ca origine cît și ca activitate; interacțiunea lor este redată în schema următoare:



Masa moleculară a chimotripsinei este de 25 100, fiind apropiată de cea a tripsinei și avînd în moleculă 242 de aminoacizi.

Labfermentul (*renina*, *chimozina*) este tot o endopeptidază și are proprietatea de a coagula laptele. Substratul său de acțiune este cazeina din lapte, care, sub acțiunea enzimei, este transformată în cazeină greu solubilă, numită paracazeină. În prima etapă se produce o ușoară hidroliză a cazeinei, care ulterior precipită sub acțiunea Ca^{2+}.

Enzima a fost obținută în stare cristalină și are masa moleculară 40 000, iar *p*H-ul optim de activitate în jur de 5. Secreția ei se face la nivelul stomacului, la animalele tinere ca miel, purcel și vițel.

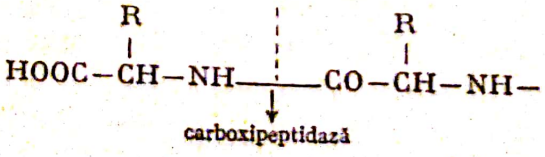
Catepsinele sînt enzimele proteolitice din interiorul celulei și activează la *p*H = 5,0—7,0. Aceste enzime există în toate țesuturile și se pare că se găsesc și în stomac și în intestin. Localizarea lor intracelulară este pe lizozomi.

Catepsinele au rol în transformarea proteinelor intracelulare și în procesul de autoliză și autodigerare. După unii autori ar exista patru catepsine.

Papaina este o endoprotează de origine vegetală, extrasă din Carica papaya. Cît privește specificitatea de acțiune, este asemănătoare cu a pepsinei și a chimotripsinei, însă efectul optim de scindare are loc în mediu neutru. În structura sa intră 180 de aminoacizi.

Exopeptidazele sînt enzime care hidrolizează dipeptidele (E u l e r, 1926) și atacă legătura peptidică a unui aminoacid terminal. Aflîndu-se alături de endopeptidaze au fost considerate ca o enzimă unitară și numite *erepsină*; în realitate este vorba de un grup de enzime.

Carboxipeptidazele se găsesc îndeosebi în sucul digestiv, dar și în rinichi, splină, pancreas etc. Aceste enzime scindează legătura peptidică în a cărei imediată vecinătate se află o grupare carboxil liberă, de forma:



Sînt scindate deosebit de ușor acele grupări terminale care au devenit libere prin acțiunea chimotripsinei.

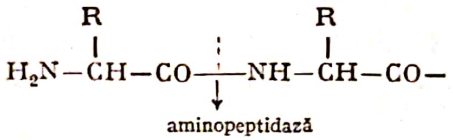
Recent s-a pus în evidență o carboxipeptidază care scindează grupările peptidice terminale rămase în urma acțiunii tripsinei, și care conțin

în vecinătatea lor aminoacizi bazici (arginină, lizină). Ambele enzime conţin în molecula lor metale (Zn^{2+}, Co^{2+}) fiind deci metaloenzime.

Activitatea enzimei este legată de prezenţa grupărilor polare ale substratului, prin care se realizează o anumită specificitate de acţiune, care se manifestă numai asupra formei *L* şi nu a celei *D*.

Din clasa carboxipeptidazelor fac parte şi aşa-numitele *acid-folic-conjugaze*, care desfac acidul glutamic din acidul pteroilheptaglutamic; ele se mai numesc şi *γ-glutamilcarboxipeptidaze*.

Aminopeptidazele desfac legătura peptidică care este în apropierea unei grupări amino libere. Cel mai cunoscut exemplu din această clasă este *L-leucilaminopeptidaza*, care hidrolizează peptidele ce conţin leucină:

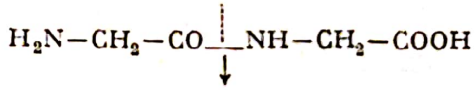


În structura lor intră metale cum sînt Mg^{2+} şi Mn^{2+}, care îi măresc activitatea. Acţiunea lor este specifică în raport cu forma *L* sau *D* a aminoacizilor. Formele *D* nu sînt hidrolizate de această enzimă.

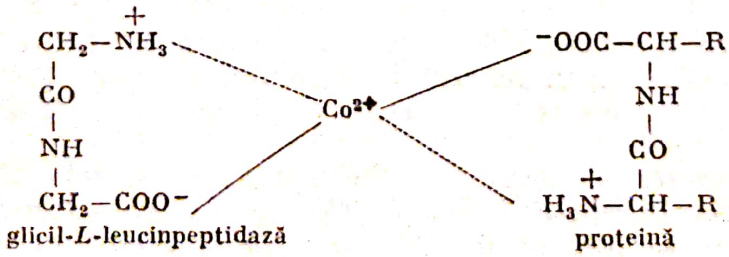
Aminopeptidazele din intestinul subţire au un *p*H optim 8—9, pe cîtă vreme cele organospecifice din rinichi şi splină acţionează la *p*H = 5.

Dipeptidazele scindează, aşa cum le arată şi numele, dipeptidele şi prezintă o mare specificitate în raport cu aminoacizii din substratul respectiv.

Glicilglicindipeptidaza hidrolizează numai dipeptidul glicilglicină, la *p*H = 7,6:



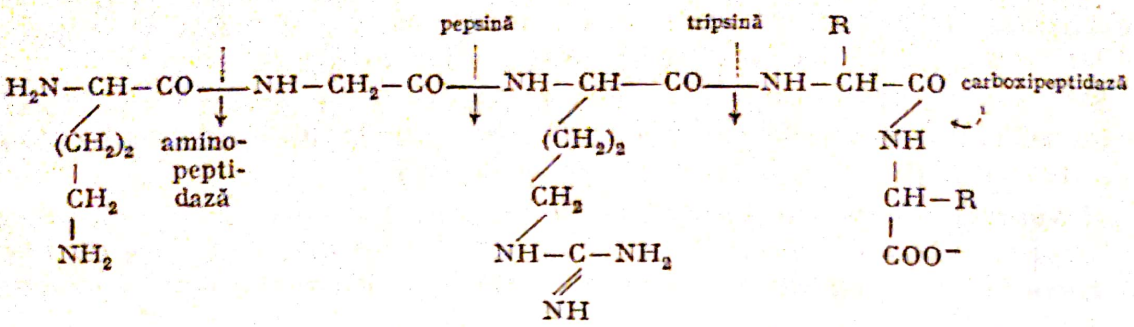
fiind activată de ionii de Co^{2+} şi de Mn^{2+}, în care caz metalul respectiv înlesneşte legătura dintre proteina enzimei şi substratul de acţiune:



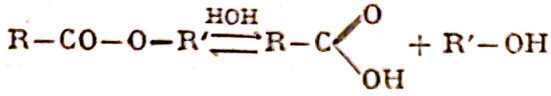
Glicil-*L*-leucina este un substrat care a fost izolat din muşchiul de iepure şi din mucoasa intestinală de porc, iar pentru hidroliză necesită prezenţa ionilor de Mn^{2+}, pe cîtă vreme enzima analoagă pentru acelaşi substrat din muşchiul uterin este activată de Zn^{2+}. Din această clasă mai sînt cunoscute şi alte enzime a căror substrat sînt tot oligopeptide printre care amintim glicil-*L*-prolinpeptidaza, *L*-cisteinilglicilpeptidaza şi altele.

Scanned with OKEN Scanner

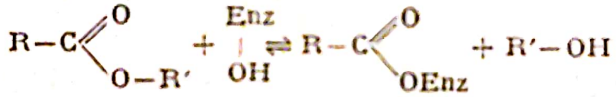
Pentru a rezuma acţiunea endopeptidazelor şi a exopeptidazelor asupra lanţului polipeptidic, se redă următoarea schemă :

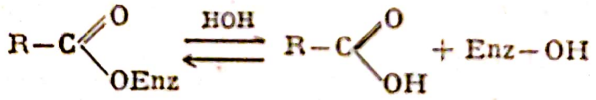


5.4.3.3. *Carboxiesterhidrolazele* (*lipazele*) fac parte din clasa hidrolazelor şi sînt enzime care catalizează desfacerea esterilor carboxilici în prezenţa apei, într-o moleculă de acid şi una de alcool, după reacţia :



Dacă partea activă a acestor enzime conţine grupări hidroxilice, mecanismul lor de acţiune poate avea loc după schema :





Lipazele care desfac lipidele simple (glicerolesterhidrolazele) se găsesc răspîndite în organismul animalelor în sucul pancreatic, în sînge, plămîn, rinichi şi în cantităţi mici în stomac.

În regnul vegetal se află mai ales în seminţele de ricin, cînepă şi in.

Trigliceridazele acţionează asupra trigliceridelor, fără o specificitate strictă, substratul fiind, în general, greu solubil în apă, hidrofob, din care cauză viteza de reacţie este mai scăzută decît în cazul substanţelor hidrofile.

Lipazele pancreatice desfac cu viteză mai mare trigliceridele acizilor graşi superiori nesaturaţi, iar *lipaza gastrică* are o viteză mai mare de hidroliză pentru esterii acizilor graşi superiori saturaţi. Hidroliza trigliceridelor se face în etape, trecîndu-se prin stadiile de digliceride şi monogliceride pînă la compuşii simpli.

Acţiunea lipazelor este favorizată de prezenţa activatorilor, cum sînt sărurile de Ca^{2+}. Explicaţia constă în formarea sărurilor de calciu de către acizii graşi eliberaţi, cu scoaterea din sistemul de reacţie a compuşilor hidrofobi şi cu deplasarea echilibrului de reacţie conform legii acţiunii maselor. Tot ca activatori mai acţionează acizii biliari şi albumina, probabil dato-

rită proprietăţilor tensioactive şi de complexare. Centrul activ al acestor enzime conţine grupări — SH, fapt demonstrat cu ajutorul metalelor grele care inhibă activitatea lipazelor. Se cunoaşte mai bine lipaza pancreatică avînd *p*H optim 8, care hidrolizează esterii polialcoolilor. Enzima este inhibată de chinină şi este rezistentă la atoxil. *Lipaza hepatică* este rezistentă la chinină şi inhibată de atoxil; acţionează asupra esterilor simpli.

Lecitinazele (*A*, *B* şi *C*) acţionează specific asupra diferitor legături din lecitine şi cefaline (v. „Lipide complexe").

Colesterolaza desface esterii colesterolului cu acizii graşi superiori. Este răspîndită în diferite ţesuturi animale, ca : pancreas, ficat, ser, rinichi, splină şi unele bacterii. Enzima este activată de prezenţa acizilor biliari şi inhibată de cantităţi mari de acizi graşi saturaţi.

5.4.3.4. *Alte hidrolaze* sînt următoarele : acetilcolinesteraza, fosfatazele, sulfatazele, amidazele.

5.4.3.4.1. *Acetilcolinesteraza*. Această enzimă catalizează reacţia de hidroliză a esterilor colinei, cel mai răspîndit fiind acetilcolina, esterul colinei cu acidul acetic.

Se cunosc două tipuri de colinesteraze : tipul I cu *p*H optim 7,5—8 prezintă specificitate sterică pentru acetilcolină şi se găseşte în eritrocite, fibre nervoase, sinapse, plăcile motoare terminale şi în muşchiul striat. Colinesteraza de tipul II hidrolizează şi alţi esteri ai colinei, de exemplu pe cei cu acidul propionic sau butiric, fiind nespecifică. Este răspîndită în plasmă şi pancreas, *p*H-ul optim de activitate fiind 8,5.

Acetilcolina are rol în favorizarea transmiterii curenţilor biologici la nivelul sinapselor, în timpul trecerii impulsului nervos, modificînd permeabilitatea membranei celulare pentru ionul de sodiu. Concentraţia sodiului fiind mai mare în exteriorul decît în interiorul celulei, această repartiţie inegală dă naştere la un potenţial electrocinetic de membrană, care devine activ în momentul modificării permeabilităţii lui. Acetilcolina intervine într-un timp foarte scurt (10^{-3} secunde), după care este inactivată de colinesterază prin hidroliză.

Ionii de Mg^{2+} acţionează ca activatori ai acetilcolinesterazei; la fel cisteina şi glutanionul redus. Inhibitori sînt metalele grele, unii derivaţi ai acidului fosforic, diizopropilfluorofosfatul (DFP), eserina (fitostigmina), prostigmina etc.

Hidroliza acetilcolinei este puternic exergonică. Din acest motiv, sinteza se face sub acţiunea catalitică a colinacetilazelor şi în prezenţa donatorilor de energie.

5.4.3.4.2. *Fosfatazele*. Aceste enzime pot fi *fosfomonoesteraze* şi *fosfodiesteraze*. În această categorie se încadrează şi sistemele enzimatice care catalizează hidroliza pirofosfatului, numite *pirofosfatfosfohidrolaze*, care intervin într-o serie întreagă de reacţii din metabolismul intermediar. Mecanismul de acţiune a acestor enzime este cel general pentru hidrolaze; prin hidroliză se pune în libertate alcoolul şi acidul fosforic.

În funcţie de *p*H-ul optim de acţiune, se cunosc mai multe fosfomonoesteraze, şi anume : de tip I cu *p*H optim 8,6—9,4; de tip II, cu *p*H optim 5—5,5; de tip III, cu *p*H optim 3,4—4,2.

Cele de tip I sînt foarte răspîndite în ţesuturile animale şi se numesc *fosfataze alcaline*. Se găsesc în epiteliul intestinal şi renal, precum şi în

oase, unde îndeplinesc importantul rol de eliberare a acidului fosforic din diferiți compuși biologici.

Fosfomonoesterazele de tip II, cu *p*H optim de activitate 5,0—5,5 sînt răspîndite în rinichi, splină și prostată, unde îndeplinesc același rol în metabolismul fosforului și esterilor, însă pentru produșii hidrolizați în mediu acid. Nu sînt activate de ioni de Mg^{2+} și sînt inhibate de fluoruri și oxalați. Ele se mai găsesc în semințele plantelor oleaginoase, în cartofi și în unele bacterii.

Fosfomonoesterazele de tip II, acționează la *p*H acid de 3,4—4,2 și se găsesc răspîndite în eritrocite, ficat și splină. Sînt inhibate de Mg^{2+} și F^- și activate de cisteină.

Tot din clasa fosfomonoesterazelor face parte *glucozo*-**6**-*fosfataza*, care acționează asupra esterului *Cori*.

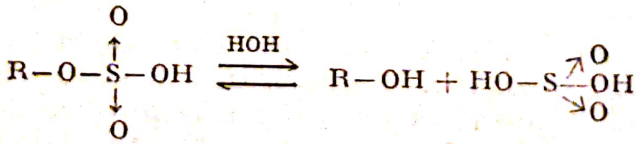
Fosfodiesterazele apar alături de monofosfataze în țesuturile animale și vegetale. Din această categorie, mai importante sînt *nucleazele*, enzime de depolimerizare a acizilor nucleici, care, după natura substratului catalizat se numesc *ribonucleaze* (RN-aze) și *dezoxiribonucleaze* (DN-aze).

Ribonucleaza catalizează depolimerizarea acidului ribonucleic. A fost obținută în stare cristalină din pancreasul bovin, proteina fiind din grupul albuminelor, cu masa moleculară 15 000. Acțiunea ei se manifestă mai ales asupra legăturilor esterice dintre nucleozidele pirimidinice și acidul fosforic.

Ribonucleaza are o structură polipeptidică în care există patru punți disulfurice. Folosirea metodelor de analiză roentgenografică a permis să se determine structura spațială a acestei proteine, dispusă coplanar. Se pare că centrul activ al RN-azei este legat de acidul aspartic și histidină și ar fi situat în apropierea restului carbonului terminal. Activitatea enzimei este favorizată de ioni de Na^+ și de NH_4^+. Enzima este digerată de pepsină, nu însă și de tripsină și chimotripsină.

Dezoxiribonucleazele, putînd fi exo- și endonucleaze, acționează asupra legăturilor diesterice, cu depolimerizarea ADN, fără a elibera acid fosforic, ci numai nucleotide și oligonucleotide. Unele hidrolizează legăturile esterice între acidul fosforic și hidroxilul din poziția **3′**, altele, legăturile acidului fosforic cu hidroxilul din **5′**. Astfel de dezoxiribonucleaze se extrag din veninul unor șerpi și splina de bovine.

5.4.3.4.3. *Sulfatazele.* Acestea sînt enzime care catalizează hidroliza esterilor acidului sulfuric cu diferiți compuși organici după reacția:



În funcție de restul organic legat de acidul sulfuric se cunosc: *arilsulfataze*, *alchilsulfataze*, *glucosulfataze* și *glucozilsulfataze*. Aceste enzime sînt răspîndite atît în regnul vegetal, cît și în cel animal, unde hidrolizează esterii acidului sulfuric.

5.4.3.4.4. *Amidazele.* Sînt enzime care catalizează dezaminarea diferiților compuși biologici. Printre acestea sînt de menționat: *ureaza*, care desface ureea în CO_2 și NH_3, *asparaginaza*, care catalizează desfacerea

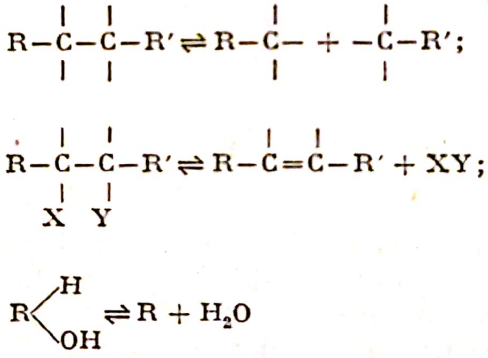
asparaginei în acid aspartic și NH_3, precum și *glutaminaza*, care este mai răspîndită în regnul animal și acționează în mod identic cu asparaginaza, mai frecvent întîlnită în regnul vegetal.

Amidazele care dezaminează bazele purinice și nucleotidele se numesc *cicloamidaze*. *Adenaza* acționează asupra adeninei, transformînd-o în hipoxantină. S-a identificat în laptele de vacă și mușchii bovinelor.

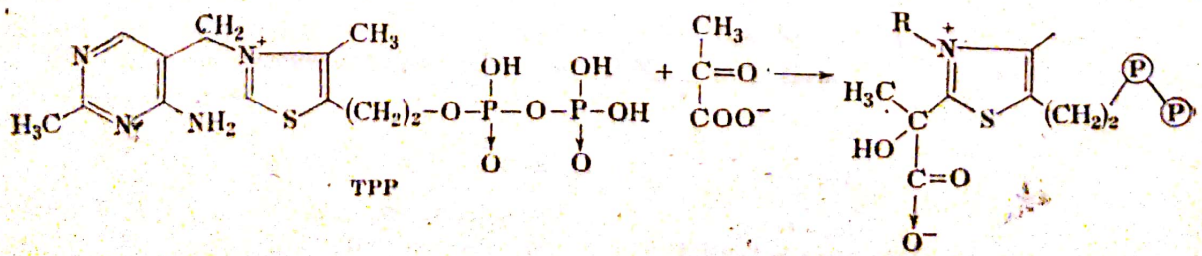
Guanidinamidaza catalizează dezaminarea hidrolitică a guaninei cu formare de xantină și amoniac. Se găsește în creierul și pancreasul de porc și în creierul, ficatul și splina de pisică. Din această categorie mai fac parte *adenozinamidaza*, *citidinamidaza* etc. Sînt de asemenea de menționat *penicilinazele*, enzime care sînt produse de mai multe bacterii — numite penicilinorezistente — avînd proprietatea de a cataliza hidroliza moleculei de penicilină.

5.4.4. LIAZELE

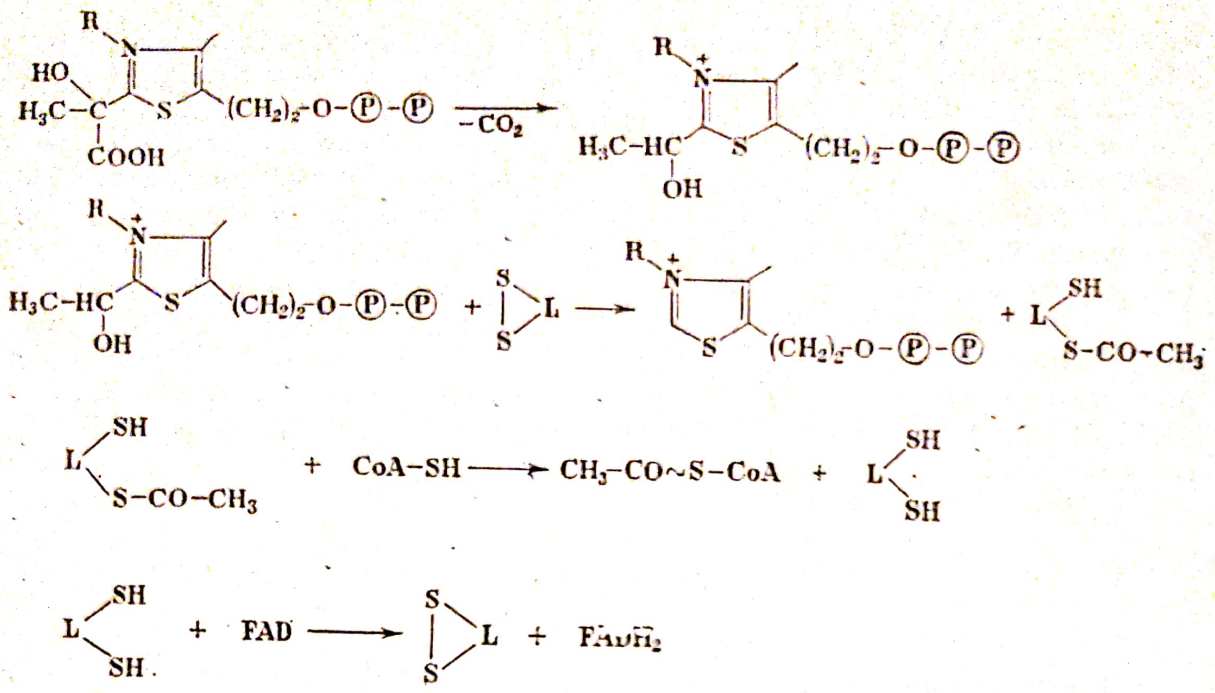
Aceste sisteme enzimatice catalizează reacțiile de desfacere (sau de formare) a diferitor legături dintre atomi sau fragmente moleculare incluzînd formarea și ruperea dublelor legături. Dacă la reacții participă și apa, aceasta este fixată sau eliminată în totalitate. Mecanismele generale de acțiune pot fi reprezentate astfel:



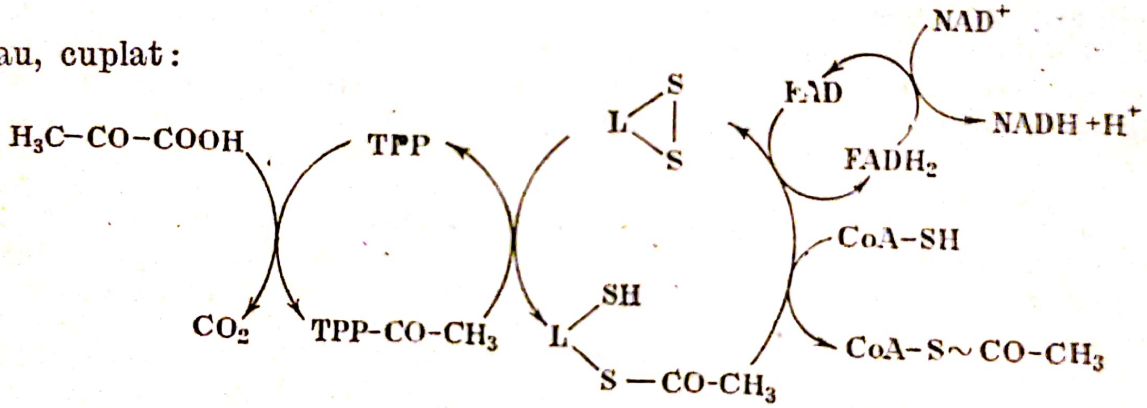
5.4.4.1. *Liazele carbon-carbon* sau *carboxilazele* includ *piruvatdecarboxilaza*, *malonildecarboxilaza* etc. Piruvatdecarboxilaza catalizează reacția de decarboxilare a acidului piruvic, trecîndu-l în aldehidă acetică și bioxid de carbon; sistemul enzimatic cuprinde ca grupări prostetice TPP, lipoamida și CoA, mecanismul reacției fiind următorul:



TPP

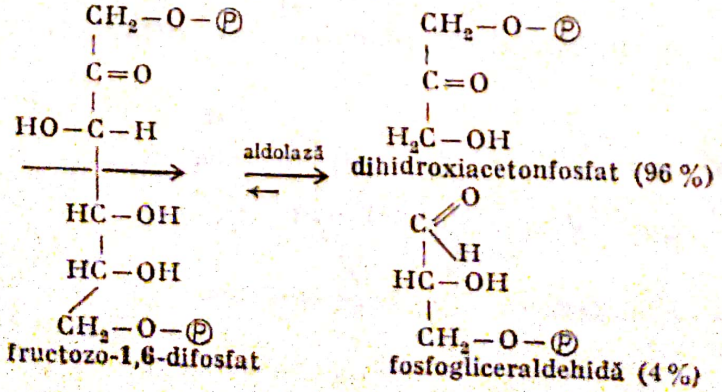


sau, cuplat:



Activitatea enzimei din drojdie este maximă la $pH = 6$ și este influențată pozitiv de ionii de Mg^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+} și Fe^{2+}, nu însă de ionii trivalenți. Viteza de decarboxilare a piruvatului induce asupra glicolizei un efect de stimulare sau de inhibare printr-un mecanism de *feed-back*. Un mol de enzimă din drojdia de bere în condiții optime are K_m pentru piruvat de $3 \cdot 10^{-3}$ M.

Dintre liazele carbon-carbon fac parte și *aldehidliazele*. *Aldolaza* catalizează reacția-cheie de *pacemaker* a glicolizei, prin care de la o moleculă de fructozo-**1,6**-difosfat se ajunge la două molecule de trioze:



Are *p*H-ul optim de acţiune în jurul lui 7. Această comportare mai laxă legată de *p*H ne indică marea sa capacitate de adaptare legată, de-altfel, de importanţa glicolizei pentru toate formele de viaţă.

Reacţia inversă, de condensare a două molecule de trioze pentru a forma una de hexoză, este catalizată de acelaşi sistem enzimatic. Mecanismul este asemănător cu cel cunoscut în chimia organică, de condensare aldolică.

Condensarea aldolică este întîlnită în ciclul seduloheptulozei din mecanismul fotosintezei.

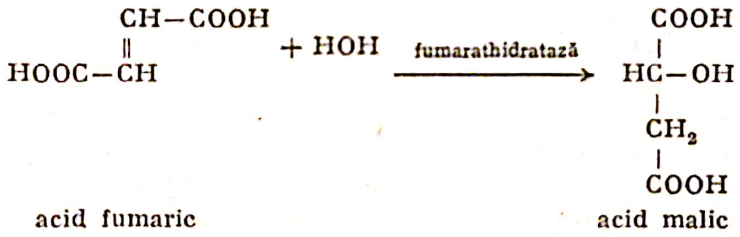
Exemple de condensare aldolică catalizate de aldolază sînt şi următoarele reacţii :

— dihidroxiacetonfosfat + *D*-gliceraldehidă → *D*-fructozo-1-fosfat

— dihidroxiacetonfosfat + *L*-gliceraldehidă → *L*-sorbozo-1-fosfat

— dihidroxiacetonfosfat + acetaldehidă → metiltetrozo-1-fosfat

5.4.4.2. *Liazele carbon-oxigen* includ *hidroliazele* care catalizează adiţia moleculei de apă la dubla legătură. De exemplu, *fumarathidrataza* înlesneşte adiţia apei la dubla legătură a acidului fumaric, trecîndu-l în acid malic :



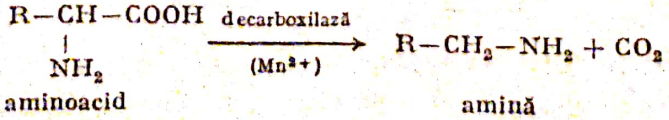
acid fumaric — acid malic

La 20°C, în tampon fosfat 0,03 M, activitatea de hidratare a enzimei este de 10^5 moli fumarat hidrataţi/mol de enzimă·minut.

Enzima este inhibată, prin comparaţie, de substanţe asemănătoare din punct de vedere structural, cum sînt : acidul malonic, acidul succinic, acidul maleic, *cis*-aconitatul.

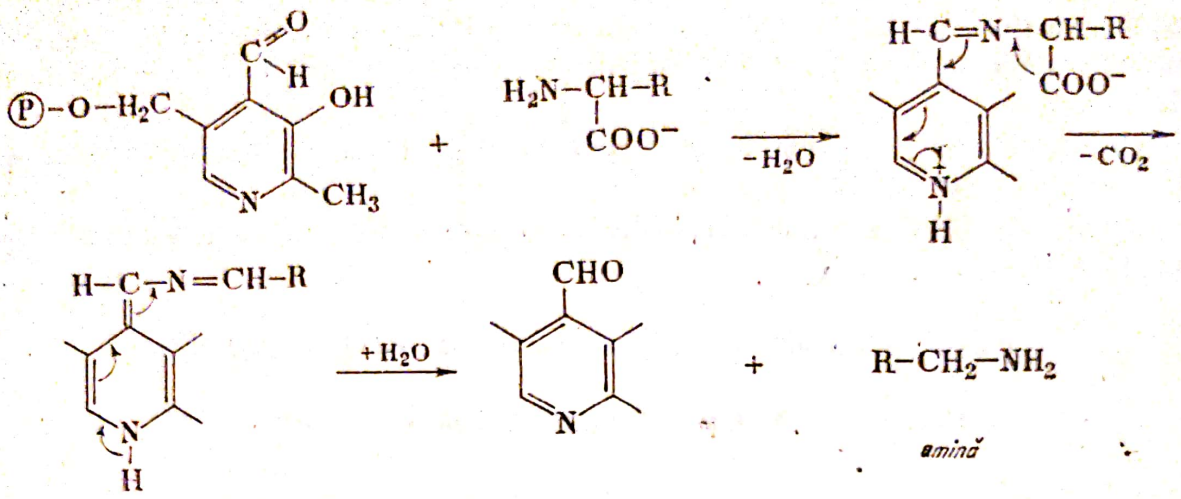
Tot din această clasă mai fac parte şi alte sisteme enzimatice, care catalizează adiţia apei la dubla legătură, dintre care amintim : *cis-aconitathidratazele*, *crotonilhidratazele* şi *anhidraza carbonică*.

5.4.4.3. *Liazele carbon-azot* cuprind şi *aminoacidliazele* care catalizează reacţiile de desfacere a diferiţilor compuşi ai carbonului cu azotul. În această clasă se încadrează sistemele enzimatice de decarboxilare a aminoacizilor sau *aminoaciddecarboxilazele*. Reacţia generală catalizată de aceste sisteme enzimatice este de forma :



aminoacid — amină

Mecanismul procesului decarboxilării este complex. Deoarece partea activă a aminoaciddecarboxilazelor o constituie piridoxalfosfatul, acesta va fi principalul partener de reacție, care are loc după schema următoare :



Procesul decarboxilării aminoacizilor apare la plante, microorganisme și animale ca un mecanism prin care viețuitoarele formează amine biogene, participante ulterior la procesele de autoreglare și autocontrol, cum ar fi : serotonina (rezultată din **5**-hidroxitriptofan), etanolamina (din serină), acidul γ-aminobutiric (din acid glutamic). În ultimul timp în ribozomi s-au identificat cadaverina (care provine din lizină) și putresceina (care provine din ornitină). Cisteamina sau tioetanolamina, partea activă din CoA, este rezultatul decarboxilării cisteinei.

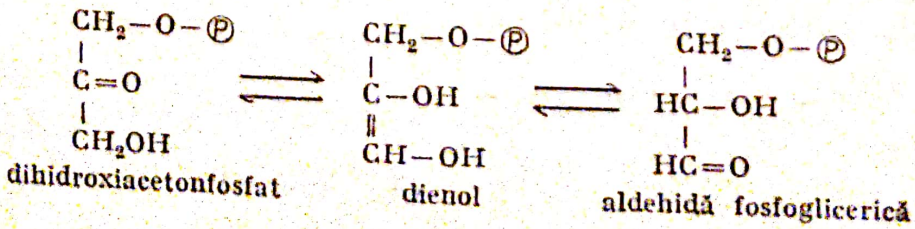
Enzimele din această clasă au un rol important în reglarea și autocoordonarea metabolismului intermediar, fiind implicate în biosinteza de hormoni și enzime. Din aceste motive ele au o specificitate mare, catalizînd de exemplu numai decarboxilarea aminoacizilor naturali din seria *L*, nu și a acelora din seria *D*.

5.4.5. IZOMERAZELE

Din această clasă fac parte *racemazele* și *epimerazele*, sisteme enzimatice care catalizează reacțiile de trecere dintr-o formă izomeră în altă formă izomeră.

Acțiunea catalitică a racemazelor și epimerazelor este de rearanjare intramoleculară, prin reacții electrofile sau nucleofile.

De exemplu, trecerea dihidroxiacetonfosfatului în aldehidă fosfoglicerică se realizează printr-o reacție de epimerizare, după următorul mecanism :



Scanned with OKEN Scanner

În acest caz, acțiunea catalitică a enzimelor se explică prin deplasarea unui proton și formarea unui carboion în echilibru cu forma labilă a dienolului.

Forma enolică are o configurație coplanară, iar enzima poate să lege protonul (H^+) în orice parte a planului, putînd da naștere atît formei *L* din *D*, cît și invers.

În acest mod acționează și racemazele aminoacizilor, care catalizează trecerea formelor active *L* în *D* și invers :

L-alanină $\rightleftharpoons$ *D*-alanină

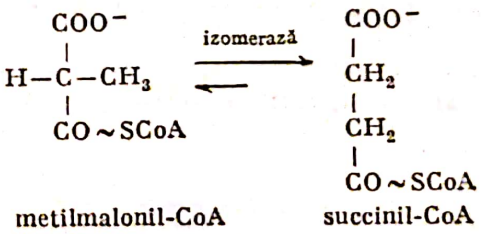
acid *D*-glutamic $\rightleftharpoons$ acid *L*-glutamic

Tipul acesta de conversiune este important cînd prin alimentație ajung forme *D* care trebuie convertite în forme *L* naturale. În tumorile maligne s-a constatat creșterea eliminării urinare a aminoacizilor din seria *D*.

Tot printr-un mecanism de epimerizare, avînd la bază o reacție prototropă, se explică trecerea celor trei hexoze una în alta : glucoza trece în fructoză și manoză, fructoza în glucoză și manoză, iar manoza în glucoză și fructoză. Acest proces este cunoscut sub denumirea de epimerizare a hexozelor sau transpoziția Lobry de Bruyn—von Eckenstein.

Acest tip de transpoziție are loc prin tratarea glucozei, manozei sau fructozei cu o soluție diluată de alcalii care determină procesul de epimerizare pînă la stabilirea unui echilibru între cele trei forme epimere : *D*-glucoză 63,5 % + *D*-manoză 2,5 % + *D*-fructoză 31 % ; pe lîngă acești compuși mai apar 3 % produși secundari nedefiniți.

Efectul catalitic al bazelor se explică, și în acest caz, prin extragerea unui proton cu formarea unui carbanion în echilibru cu un ion de dienolat, cum probabil are loc și reacția :



metilmalonil-CoA succinil-CoA

Fosfoglucoizomerazele (*oxidoreductazele intramoleculare*) sînt sisteme enzimatice care fac interconvertirea aldozelor în cetoze, prin oxidarea grupării alcool secundar la cetonă, concomitent cu rèducerea aldehidei la alcool primar. De exemplu, *fosfohexozoiomeraza* (PHI) care catalizează trecerea G-6-P în F-6-P.

În concentrații fiziologice, ionii metalelor alcaline și alcalinopămîntoase sînt activatori ai *fosfohexozoizomerazei*. Dacă însă concentrația de K^+, Ca^{2+} sau NH_4^+ depășește valoarea de $4 \cdot 10^{-2}$ M se constată o inhibare cu 40 — 60 % în activitatea enzimei.

Schimbarea în activitatea fosfohexoizomerazei a fost corelată cu unele afecțiuni ale ficatului și hematopoiezei, cu tumori etc.

Fosfomanozoizomeraza catalizează trecerea *D*-manozo-6-fosfatului M-6-P în F-6-P, formă care este capabilă ulterior să treacă spre fosfotrioze :

$$\text{M-6-P} \xrightleftharpoons[\text{izomerază}]{\text{fosfomanozo-}} \text{F-6-P}$$

Această enzimă s-a găsit în drojdia de bere, mușchi, mucoasă intestinală, ficat, inimă, creier, plămîni și este ușor inactivată de metalele grele și de temperatura peste 40°C.

Izomerazele cu acțiune de transfer intramolecular sînt cunoscute și sub denumirea de *mutaze*. Ele catalizează reacții de transfer de la un atom la altul a unor grupări funcționale din cadrul aceleiași molecule.

Din această clasă fac parte de exemplu *fosfomutazele*, care intervin în metabolismul glucidic; dintre ele, *fosfoglucomutaza* este răspîndită pretutindeni :

$$\text{G-1-P} \rightleftharpoons \text{G-6-P}$$

Activitatea acestei enzime, PGM, este de 16 800 mol gluc/10^5g proteină · ·min la 30°C și pH = 7,5. Este activată de ioni de Mg^{2+} și Co^{2+}, în concentrații optime de $5 \cdot 10^{-4}$ M. Este inhibată de Zn^{2+}, Cu^{2+}, Hg^{2+} și Ag^{+}, precum și de fluor, care leagă ionul de Mg^{2+}.

Fosfogliceromutaza catalizează în timpul glicolizei reacția de trecere a fosfatului de la C_3 la C_2 :

$$\text{acid 3-fosfogliceric} \rightleftharpoons \text{acid 2-fosfogliceric}$$

Activitatea optimă, atît pentru enzima extrasă din drojdia de bere, cît și pentru cea din mușchi, este la pH = 5,9 la 30°C; enzima este inhibată de Zn^{2+}.

Fosforibomutaza care s-a găsit în sînge, ficat, mușchi, drojdie de bere, catalizează reacția următoare:

$$D\text{-ribozo-1-fosfat} \rightleftharpoons D\text{-ribozo-5-fosfat}$$

Are pH-ul optim de activitate 7,4, este inhibată de Ba^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+} și Fe^{2+} și are o activitate slabă asupra dezoxiribozei.

5.4.6. LIGAZELE

Sistemele enzimatice din această clasă leagă două molecule, simultan cu intervenția ATP. Energia care se eliberează prin hidroliza ATP se folosește imediat pentru sinteza a noi molecule.

Mecanismul de acțiune al ligazelor poate fi schematizat în forma generală următoare:

$$B + ATP \rightarrow B{-}P + ADP$$

$$B{-}P + A \rightarrow A{-}B + P_i$$

Există însă ligaze care utilizează energia rezultată prin eliberarea din ATP a PP_i. În cazul biosintezei de glutation intervine un mecanism

Scanned with OKEN Scanner

de triplu transfer; glutationul, compus important în reacţiile redox, este sintetizat în organismele vii în două etape, fiecare etapă fiind catalizată de sisteme enzimatice specifice. Aceste enzime au fost puse în evidenţă în drojdia de bere, microorganisme, plante şi diferite ţesuturi animale (ficat, mucoasă intestinală, creier etc.).

Într-o primă etapă, acidul glutamic, cisteina şi ATP formează un dipeptid, conform reacţiei următoare:

$$\text{acid } L\text{-glutamic} + L\text{-cisteină} + \text{ATP} \rightleftharpoons L\text{-}\gamma\text{-glutamil} - L\text{-cisteină} + \text{ADP} + P_i$$

reacţie care, de fapt, se petrece după un mecanism de triplu transfer:

$$\text{ATP} + \text{Enz} \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{Enz-P} + \text{ADP}$$

$$\text{Enz-P} + L\text{-glutamat} \xrightarrow{(Na^+,\ K^+)} \text{Enz-glutamat} + P_i$$

$$\text{Enz-glutamat} + L\text{-cisteină} \rightarrow \text{Enz} + \text{glutamilcistină}$$

Desfăşurarea reacţiilor de mai sus are loc la *p*H optim 8,3, iar ADP şi fluorurile inhibă viteza de reacţie.

Etapa a doua a fost studiată cu sisteme enzimatice mitocondriale din ficat şi drojdie de bere. Acestea necesită o nouă moleculă de ATP pentru a furniza energia necesară de unire a dipeptidului glutamilcisteină cu glicina după reacţia:

$$L\text{-}\gamma\text{-glutamil-}L\text{-cisteină} + \text{glicină} + \text{ATP} \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{glutation} + \text{ADP} + P_i.$$

Pentru activitatea enzimei este necesară prezenţa ionilor de Mg^{2+} într-o concentraţie optimă 0,01 M; ionul K^+ este esenţial în reacţie.

Ligazele aminoacid-ARN participă la activarea aminoacizilor, în vederea biosintezei de proteine. Energia necesară activării aminoacizilor este dată de ATP, care pune în libertate pirofosfat, AMP legîndu-se de aminoacid după următoarea schemă:

$$\underset{\text{aminoacid}}{R-\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}-COO^-} + \text{ATP} \underset{\text{ligază}}{\rightleftharpoons} \underset{\text{aminoacid activat}}{R-\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}-\overset{\displaystyle O}{\overset{\|}{C}}-O-\text{AMP}} + PP_i$$

Aminoacidul astfel activat este trecut pe fracţiunea de ARN solubil (ARN_t) din citoplasmă. Acest ARN_t îndeplineşte rolul de transportor al aminoacidului pe enzima specifică, în vederea formării legăturii peptidice, în ordinea transmisă de sistemul de codificare prezent pe ARN_m specific (v. „Biosinteza proteinelor").

Ligazele aminoacid-amoniac catalizează reacţia de legare a amoniacului pe aminoacizi dicarboxilici, cum sînt acidul glutamic şi cel aspartic, cu formarea amidelor respective.

Glutaminligaza se găseşte răspîndită în bacterii, plante şi animale. Intervine într-o serie de reacţii din metabolismul intermediar, inclusiv aceea de detoxifiere a creierului de amoniac, prin formarea amidei după reacţia:

$$\text{acid } L\text{-glutamic} + NH_3 + \text{ATP} \xrightarrow{Mg^{2+}} L\text{-glutamină} + \text{ADP} + P_i$$

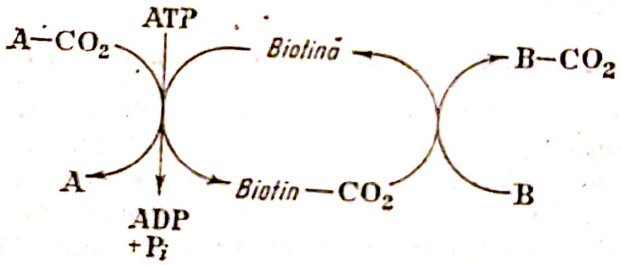
Enzima este activată de Mg^{2+} și inhibată de Ca^{2+}. Are o acțiune specifică care nu se suprapune *aspartilligazei.*

Formarea amidelor, așa cum am amintit, are ca scop detoxifierea organismului de NH_3, care rezultă în cantități mari din catabolismul proteinelor. Amidele nou formate, în cantitate mare carbodiamida sau ureea, au un caracter slab acid, care nu produce deplasarea echilibrului acido-bazic din țesutul respectiv. Caracterul slab acid se datorește repartizării electronilor π între cele două grupări amino și carbonil (rezonanță).

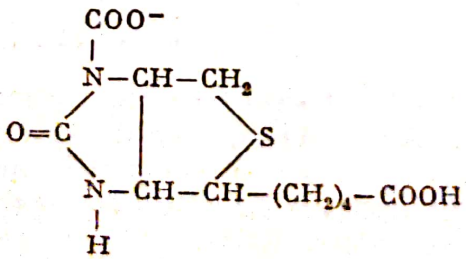
Enzimele de carboxilare au fost puse mai întîi în evidență de W o o d (1938) care a arătat posibilitatea legării CO_2 la acidul piruvic cu formarea de acid oxalacetic. Cercetările din ultimii ani făcute de L y n e n și colab. au dovedit posibilitatea acestei reacții, arătind totodată că enzima care o catalizează are drept grupare prostetică biotina. Alături de această enzimă mai participă la reacție ATP și CoA care, în prealabil activează acizii:

$$\text{piruvat} + CO_2 + \text{ATP} \rightarrow \text{oxalacetat} + \text{ADP} + P_i$$

Reacția se poate reprezenta prin schema:



Rolul biotinei este de a activa CO_2, pe care îl leagă la unul din atomii de azot, în formă ionizată, activă, ca în formula următoare:



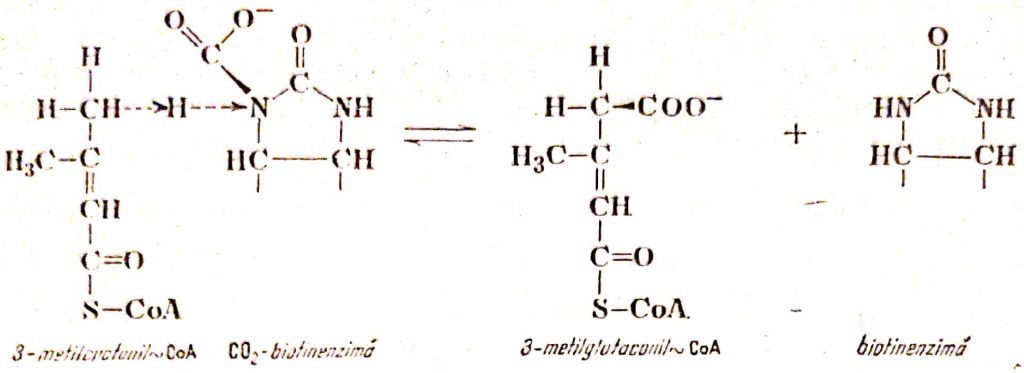
biotină cu CO_2 activat

Fixarea CO_2 apare ca o necesitate de prim ordin în fotosinteză, în biosinteza lipidelor și în ciclul K r e b s, motiv pentru care sistemele enzimatice din această clasă sînt larg răspîndite.

Mecanismul de trecere a CO_2 activat de biotinenzime pe diverse substraturi, cum ar fi piruvatul, acetatul, metilcrotonil-CoA etc., a fost lămu-

Scanned with OKEN Scanner

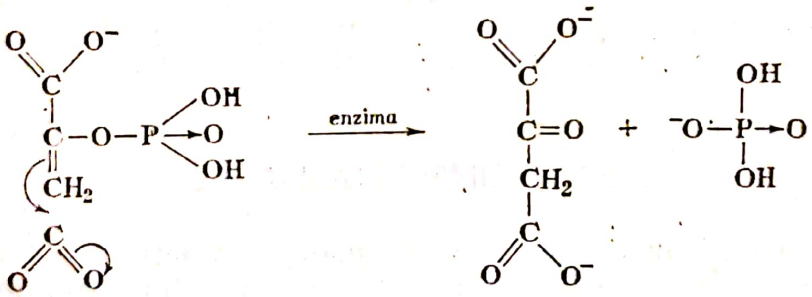
rit tot de L y n e n și școala sa, fiind de forma următoare :



Fosfoenolpiruvatcarboxilaza se încadrează în aceste sisteme enzimatice și catalizează următoarea reacție :

$$PEP + CO_2 \xrightarrow{+H_2O} \text{oxalacetat} + P_i (\Delta G = 5{,}7 \text{ kcal})$$

Această enzimă este responsabilă, de fapt, de procesul fundamental de fixare a CO_2, în fotosinteză. Este activată de ioni de Mg^{2+}, Mn^{2+} și Cd^{2+}, iar energia liberă $\Delta G°$ pusă în joc în reacție a fost calculată ca fiind —5,7 kcal la 25°C. Mecanismul prin care se realizează legarea CO_2 la fosfoenolpiruvat este de forma :



Acetil-CoA-carboxiligaza participă la formarea malonilcoenzimei A din acetil-CoA și CO_2, reacție ce constituie prima secvență în biosinteza acizilor grași din microorganisme, plante și animale. Legarea CO_2 la acetil-CoA se face în prezența ATP și a enzimelor de carboxilare, după următoarea schemă de reacții :

$$CH_3COO^- + ATP + CoASH \xrightarrow{Mg^{2+}} CH_3-CO\sim SCoA + ADP + P_i$$

$$HCO_3^- + ATP + \text{Biot-Enz} \xrightarrow{Mn^{2+}} \text{Biot-Enz} \cdot CO_2 + P_i + ADP$$

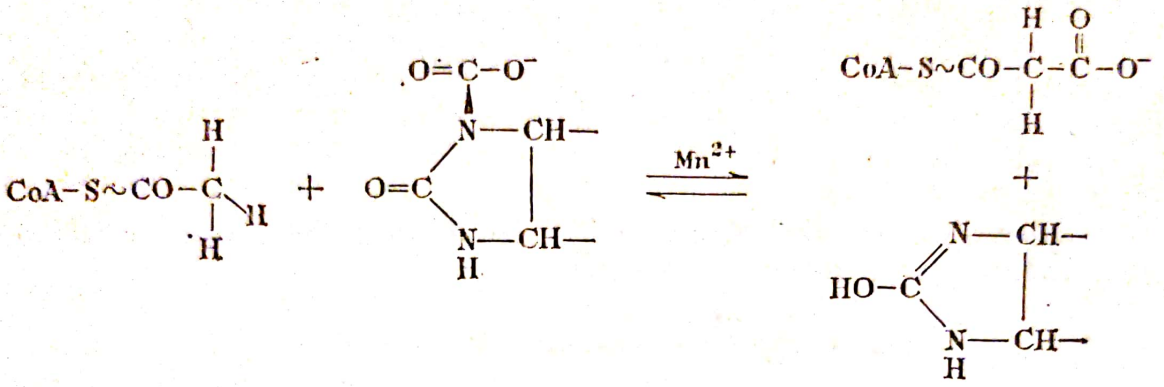
$$CH_3-CO\sim SCoA + \text{Biot-Enz}.CO_2 \longrightarrow HOOC-CH_2-CO\sim SCoA + \text{Biot-Enz}$$

Citratul extramitocondrial este cunoscut ca un stimulator și precursor în sinteza acizilor grași : se presupune că ar fi chiar sursa majoră de acetil-SCoA în acest proces. Fracțiunea extramitocondrială este bogată în acetil-SCoA care provine din *pool*-ul intramitocondrial.

Scanned with OKEN Scanner

S-a arătat că acetil-CoA-carboxiligaza extrasă din *Achromobacter* are o activitate de carboxilare de 2 micromoli malonil-CoA/mg proteină/30 min.

Acetil-CoA-carboxiligaza este formată dintr-un complex multienzimatic, care la temperatura de +4°C este sub formă de monomer, iar la +37°C este tetramer, care intervine în reacţiile de transcarboxilare după un mecanism de forma:



În procesul de transcarboxilare de mai sus, inducţia se exercită de la S-acetil-CoA, gruparea CO_2 substituind electrofil un hidrogen al grupei metil. Energia liberă a acestei reacţii la pH = 7,0 este ΔG° = 4,7 kcal/mol. Sistemul multienzimatic carboxibiotină, la pH = 6,8 şi 20°C, are perioada de înjumătăţire de 140 minute (L y n e n), iar în aceleaşi condiţii, în absenţa substratului, se inactivează în 10 minute. Probabil că modificarea configuraţiei spaţiale a proteinei enzimatice, prin legarea cu substratul, este cauza acestui efect de stabilitate relativă.

5.5. ENZIMELE PLASMATICE

Există o serie de enzime care îşi manifestă activitatea catalitică la nivelul plasmei. Între acestea se menţionează în primul rînd enzimele implicate în coagularea sîngelui, apoi o serie de lipaze şi *pseudocolinesteraza* (colinesteraza nespecifică). Aceste enzime sînt sintetizate de diferite organe, în special de ficat şi sînt secretate în stare activă în plasmă unde catalizează reacţii specifice.

Celelalte enzime care se găsesc în plasmă — numărul lor este destul de mare — nu au rol catalitic la acest nivel. Prezenţa lor în plasmă este pusă în legătură cu reînnoirea fiziologică a celulelor, precum şi cu eliberarea enzimelor celulare în cursul efortului fizic. În primul caz, eliberarea enzimelor este datorată destrucţiei celulelor, în cel de al doilea permeabilitatea membranelor celulare joacă un rol deosebit de important, aceasta asigurînd constant trecerea unor cantităţi mici de enzime în plasmă, proces care este însă amplificat în cursul eforturilor musculare intense.

În condiţii fiziologice normale, concentraţia enzimelor cu sau fără rol catalitic în plasmă, este cuprinsă între anumite limite considerate valori normale (tab. 20). Constanta concentraţiei în plasmă a fiecărei enzime este rezultatul echilibrului care se stabileşte între viteza destrucţiei celulare pe

de o parte şi a inactivării şi eliminării urinare pe de altă parte. Într-adevăr, durata de viaţă a enzimelor în plasmă este mult mai mică decît în celule. Ea se exprimă prin „timpul de înjumătăţire", durată după care activi-

TABELUL 20

Valorile normale ale activităţii unora din cele mai importante enzime plasmatice

Enzima	Activitate
Aldolază	0,9 — 2,5 mU/ml
Amilază	80 — 180 unităţi Somogyi/100 ml
Fosfatază alcalină	20 — 48 mU/ml
„ acidă	< 11 mU/ml
GOT	4 — 22 mU/ml
GPT	2 — 24 mU/ml
LDH	195 mU/ml
CPK	< 40 mU/ml

tatea enzimei se reduce la jumătate (50 ore GOT şi LDH, 75 ore GPT etc.). De acest fapt trebuie să se ţină seama atunci cînd se fac determinări enzimatice în laboratoarele de biochimie clinică.

Abateri de la valorile normale prezentate în tabelul 19, în sensul scăderii sau creşterii concentraţiei(activităţii) enzimelor, se produc în cazurile în care sînt afectate ţesuturile sau organele care secretă respectivele enzime în plasmă. Studii experimentale, de exemplu provocarea la animale de experienţă a unor infarcte miocardice sau a unor hepatite toxice (prin administrarea de tetraclorură de carbon) au evidenţiat o relaţie directă între gravitatea leziunii şi creşterea concentraţiei unora dintre enzimele serice (fig. 33). Activitatea maximă după producerea leziunii celulare este

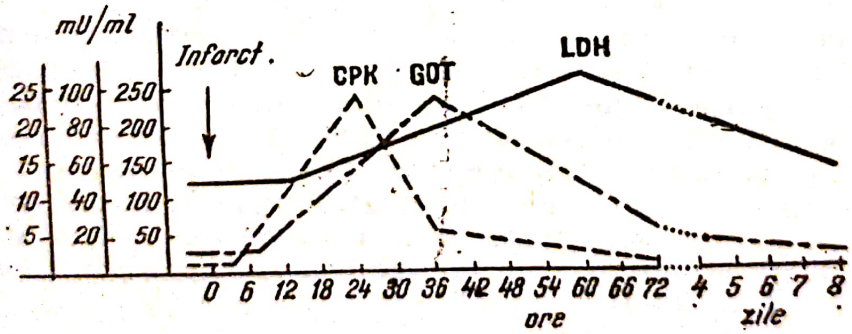


Fig. 33. Variaţia activităţii unor enzime serice, după infarctul miocardic.

diferită de la o enzimă la alta; este desigur necesar să existe creşteri (sau scăderi) suficient de pronunţate faţă de valorile normale pentru ca determinarea enzimatică să poată constitui un test al afecţiunii. Pe de altă parte, o situaţie ideală pentru clinică ar fi aceea ca pentru diferite ţesuturi şi organe să existe în plasmă enzime strict specifice. Dacă există cîteva enzime plasmatice produse în întregime de ficat (sorbitoldehidrogenaza,

glutamicodehidrogenaza, ornitincarbamiltransferaza, fructozo-1-fosfat-aldolaza) sau CPK produsă de mușchi, alte țesuturi sau organe nu sînt reprezentate de enzime strict specifice. Totuși se poate realiza un diagnostic diferențiat prin determinarea activității cîtorva enzime dintre care majoritatea sînt furnizate plasmei de către două sau chiar mai multe țesuturi sau organe. Ne referim în primul rînd la transaminaze și dintre acestea în mod special la GOT și GPT. Astfel, afecțiunile hepatice se caracterizează printr-o creștere a activității GPT superioară creșterii activității GOT. Faptul se explică prin aceea că GPT se află localizată exclusiv în citoplasmă, în timp ce GOT se află în proporție de 60% în citoplasmă și 40% în mitocondrii; la o lezare discretă a celulelor hepatice se vor elibera în ser în mod special enzimele citoplasmatice. Aceasta face ca raportul GOT/GPT, numit raportul lui D e R i t i s, care la indivizii sănătoși are valoarea în jur de 1,3 să se modifice devenind mai mic decît unu (între 0,7 —0,4) la cei suferinzi de hepatită. Este de menționat și faptul că în cazul icterului, activitatea serică a GOT și GPT crește cu cca o săptămînă înaintea creșterii bilirubinei. Revenirea spre normal a acestor indici se face, în cazul unei evoluții favorabile, după cca 5 —7 săptămîni, valorile rămînînd ridicate atîta vreme cît persistă procesele citolitice.

În cazul determinării simultane a GOT, GPT și G1DH, raportul GOT + GPT/G1DH este ridicat (în jur de 50) în cazul hepatitelor acute, are valori de 5 —15 în cazul celor cronice sau în ciroză și sub 10 în cazul metastazelor hepatice.

În mod curent se determină în laboratoarele clinice și fosfatazele. Fosfataza alcalină prezintă valori ridicate în icterul obstructiv, dar și în cazul unor sarcoame osteoblastice, în hiperparatiroidism și carcinomul metastatic. Nivelul fosfatazei acide este crescut în cazul cancerului de prostată și unele neoplasme ale glandei mamare. În cancerul prostatei crește în special fracțiunea tartrat inhibabilă (diferența între fosfataza acidă totală și fosfataza acidă tartrat rezistentă).

Lipaza, amilaza și colinesteraza au activitate redusă în toate afecțiunile hepatice. Valori scăzute ale lipazei se întîlnesc și în diabet, în timp ce valori peste cele normale sînt caracteristice pancreatitei acute și carcinomului pancreatic. Valori crescute ale activității amilazei se obțin în cazurile de obstrucție intestinală, pancreatită acută și diabet. Colinesteraza este una din puținele enzime care dă informații despre funcția renală; ea prezintă activitate crescută în sindromul nefrotic.

Un loc aparte între enzimele plasmatice ocupă în ultima vreme LDH. Pentru clinică are importanță atît determinarea activității globale (fig. 33—creșterea activității în infarctul miocardic) și, mai ales, activitatea izoenzimelor LDH.

5.5.1. IZOENZIMELE

S-a constatat recent că LDH, enzima ce catalizează reacția de transformare a acidului piruvic în acid lactic, se află în plasmă sub forma unui amestec de cinci compuși ușor diferiți structural între ei. Cele cinci tipuri de LDH poartă numele de izoenzimele LDH.

Scanned with OKEN Scanner

Din punct de vedere structural, fiecare dintre izoenzimele LDH este alcătuită din patru lanţuri polipeptidice. Există două tipuri de lanţuri polipeptidice, unul notat cu *H* (de la *heart* = inimă), celălalt cu *M* (de la *muscle* = muşchi). Patru lanţuri polipeptidice de tip *H* formează izoenzima H_4 aflată predominant în inimă, iar patru lanţuri de tip *M* formează izoenzima M_4 aflată predominant în muşchi; celelalte trei izoenzime sînt combinaţiile H_3M, H_2M_2 şi HM_3, între cele două tipuri de lanţuri polipeptidice.

Separarea celor cinci izoenzime LDH se poate realiza prin absorbţia diferenţiată pe DEAE-Sephadex, pe baza stabilităţii termice şi mai ales pe baza mobilităţii electroforetice. Astfel la *p*H 8,6, pe un suport de poliacrilamidă sau agar, tipul M_4 migrează spre catod, în timp ce M_3H, M_2H_2, MH_3 şi H_4 migrează spre anod cu viteză crescîndă în ordinea enumerată.

Şi din alte enzime pot fi separate prin procedee similare izoenzimele corespunzătoare. Studiul izoenzimelor prezintă pe de o parte importanţă din punctul de vedere al morfogenezei şi diferenţierii celulare, pe de altă parte legat de faptul că se produc serioase modificări, în unele stări patologice, ale raportului normal al celor cinci forme de LDH aflate în ser. Astfel, în timp ce proporţia normală în ser pentru cele cinci izoenzime, în ordinea H_4, MH_3, M_2H_2, M_3H şi M_4, este cuprinsă între limitele de la 33 —47 —16 —6 —0 la 25 —33 —21 —12 —8, în cazurile de infarct miocardic cresc foarte mult tipurile H_4 şi MH_3 în timp ce în afecţiunile celulelor hepatice există creşteri pronunţate ale tipului M_4. Există şi posibilitatea urmăririi evoluţiei bolii prin separarea izoenzimelor, mult timp după normalizarea activităţii muşchiului cardiac după infarct, existînd variaţii ale activităţii izoenzimelor LDH.

Scanned with OKEN Scanner

6 INTRODUCERE ÎN METABOLISMUL INTERMEDIAR

În orice sistem viu se desfăşoară în permanenţă numeroase reacţii fizico-chimice. Organismele vii realizează un schimb continuu de energie şi informaţie cu mediul extern, ele fiind din punct de vedere termodinamic, aşa cum s-a mai menţionat, sisteme deschise. Sistemul viu nu poate fi conceput fără aceste interrelaţii, fără desfăşurarea în permanenţă a unor procese care prelucrează compuşii şi energia luate din exterior, în urma cărora se realizează compuşi specifici. În fiecare celulă se află un număr extrem de mare de compuşi anorganici şi organici, care interacţionează în permanenţă la nivelul structurilor infracelulare. Pentru a avea o idee cît de intensă este activitatea permanentă din sistemele vii se menţionează că o celulă bacteriană conţine circa 5 000 de gene care poartă informaţia genetică, 2 500 proteine specifice, 10—300 milioane molecule care participă la cel puţin 10^5 reacţii în fiecare secundă. Se apreciază că pentru o celulă dintr-un organism superior activităţile sînt amplificate cu cel puţin patru ordine de mărime comparativ cu celula bacteriană. Dinamica este deci caracteristica fundamentală a sistemelor vii.

În lumea biologică, mişcarea poate avea numeroase şi variate forme, iar biochimia studiază practic numai interacţiunile la nivel molecular. Totalitatea reacţiilor fizico-chimice care se petrec în sistemele vii constituie *metabolismul*, iar *metaboliţi* sînt compuşii chimici transformaţi în cursul acestor reacţii. Termenul de *metabolism intermediar* descrie căile metabolice şi semnifică faptul că metabolismul are loc prin *secvenţe de reacţii*, catalizate de enzime, cu un număr important de produşi intermediari.

În cadrul metabolismului se disting reacţii de biosinteză consumatoare de energie, constituind *anabolismul*, şi reacţii de degradare, care eliberează energia ce va fi utilizată pentru alte activităţi, constituind *catabolismul*. *Metabolismul bazal* constă în comportarea organismului în condiţii standard de temperatură, presiune şi alţi factori, astfel încît consumul de energie să fie minim.

Există o mare varietate de căi de biosinteză şi degradare : căile liniare, cele mai simple, unde produsul fiecărei reacţii catalizate de o enzimă este substrat pentru următoarea ; căile ciclice, care presupun cuplarea compusului *A* cu *M*, substanţa rezultată fiind transformată pe parcursul mai mul-

tor etape în aşa fel încît A este degradat la X, iar M se regenerează şi poate să reacţioneze cu o nouă moleculă de A ; căi ciclice care se întrepătrund prin intermediul unui compus ; căi cu una sau mai multe bifurcaţii (fig. 34) :

Caracteristic pentru procesele catabolice ale glucidelor, lipidelor şi proteinelor este faptul că ele converg spre o cale finală comună. Căile anabolice prezintă dimpotrivă numeroase ramificări, ceea ce permite formarea dintr-un număr mic de compuşi iniţiali a unui număr foarte mare de compuşi celulari. Aceste caracteristici ale catabolismului şi anabolismului reflectă un principiu fundamental al organizării materiei vii, respectiv o economie maximă a compuşilor şi reacţiilor.

În virtutea principiului maximei economii ar fi de aşteptat ca şi şirul de reacţii a unei căi anabolice să fie parcurs în sensul invers al căii catabolice corespunzătoare, ceea ce presupune ca toate reacţiile să fie reversibile. Această situaţie nu se întîlneşte însă decît în mod parţial, după cum reiese din descrierea metabolismului glucidelor, lipidelor şi proteinelor. Surprinzător la prima vedere, la o analiză mai profundă faptul are mai multe explicaţii.

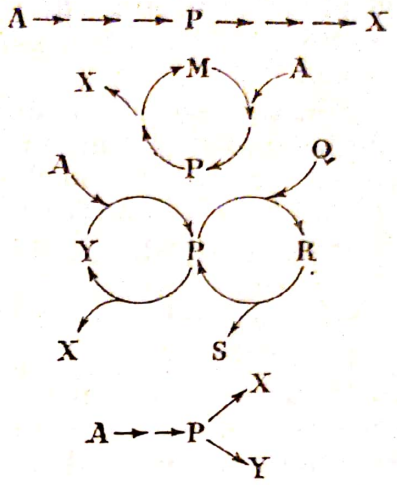


Fig. 34. Tipuri de căi metabolice : cale metabolică liniară (a), cale metabolică ciclică (b), cicluri metabolice intrepătrunse (c) cale metabolică cu bifurcaţii (d).

În primul rînd, unele reacţii caracteristice din catabolism sînt energetic imposibile pentru anabolism. În al doilea rînd, şi acest lucru este valabil mai ales pentru organismele vii superioare, procesele de degradare şi sinteză decurg în compartimente celulare diferite (de exemplu, degradarea în mitocondrii şi sinteza în citoplasmă) ; această compartimentare permite desfăşurarea simultană a celor două procese. În al treilea rînd, căile de sinteză şi cele de degradare diferă în ce priveşte reglarea prin mecanisme genetice şi alosterice.

În cazul organismelor animale superioare, metabolismul prezintă şi alte aspecte particulare, deoarece celulele sînt diferenţiate după organul din care fac parte ; printr-un mecanism complex de integrare şi transfer se asigură o intricaţie permanentă a funcţiilor acestor organe (de exemplu, rolul ficatului în biosinteza unor compuşi care vor fi transportaţi de sînge şi utilizaţi de muşchi scheletici, creier etc.).

Modularea organismului în raport cu ambianţa se face prin factori interni cu acţiune permanentă (informaţia genetică, funcţiile neuroendocrine, controlul şi autocontrolul reacţiilor biochimice) şi externi (cum ar fi cei fizico-chimici — temperatură, presiune, umiditate, poluanţi, radiaţii, — factori alimentari şi ecologici).

Cataliza şi autocataliza prin sisteme enzimatice sînt factori determinanţi în evoluţia filogenetică şi ontogenetică, cu rol de menţinere a homeostaziei dinamice, în stare normală şi patologică, a organismelor vii. Intervenţia acestora este condiţionată de informaţia genetică, care trebuie să se moduleze cu factorii de interacţiune externi şi interni pentru realizarea dinamicii biologice.

Scanned with OKEN Scanner

6.1. CELULA

Prin structura şi organizarea ei complexă, celula — substratul morfologic al tuturor manifestărilor biologice — asigură desfăşurarea proceselor vitale din organism, şi, în primul rînd, autoreproducerea şi evoluţia.

Fenomenele vieţii sînt obligatoriu legate de structură; funcţia şi structura constituie un întreg, o unitate dialectică. Formele structurale — care reprezintă substratul vital şi constituie expresia spaţială a proceselor biochimice — nu pot fi rupte de funcţie.

Prin diferitele şi numeroasele complexe mineralo-protido-glucido-lipidice, celula asigură nu numai manifestările morfologice celulare, ci şi desfăşurarea armonioasă, coordonată în timp şi spaţiu, a multiplelor reacţii biochimice.

Structurilor microscopice le corespund funcţii moleculare. Fiecare formă îşi are echivalentul ei funcţional, aşa după cum fiecărei funcţii îi corespunde un echivalent morfologic; funcţia şi forma se intercondiţionează reciproc.

În celulă, oricare ar fi forma, structura şi funcţia ei, se disting — cu ajutorul microscopului electronic — mai multe formaţiuni subcelulare. *Nucleul* este un organit central mai mult sau mai puţin sferic, refringent. El se află înconjurat de *citoplasmă*, o masă translucidă, eterogenă. Spre exterior, citoplasma este delimitată de *membrana celulară*, o stare fizico-chimică specială. În ultimele două decenii, microscopul electronic şi ultracentrifugarea au îmbogăţit cunoaşterea formaţiunilor subcelulare.

6.1.1. FORMA ŞI DIMENSIUNILE CELULELOR

Ontogenetic, majoritatea celulelor au formă relativ sferică, formă pe care ulterior o mai păstrează doar ovulele, hematiile, leucocitele şi unele celule cartilaginoase. Sub influenţa diferitelor cauze ereditare, precum şi a unor cauze mecanice interne şi externe, a unor cauze funcţionale sau ca urmare a anumitor stări fizico-chimice ale citoplasmei, majoritatea celulelor se transformă, luînd cele mai variate forme. Unele se alungesc şi devin fusiforme sau filamentoase, altele devin discoidale, eliptice, prismatice, piramidale, stelate sau cubice etc.

Cea mai mare celulă din organismul omului este ovulul (200 μ), iar printre cele mai mici se consideră anumite celule din cerebel (5—6 μ) şi unele elemente ale sîngelui, cum sînt trombocitele (3 μ). Fibrele musculare striate, care sînt celule multinucleate, pot să ajungă la 10—12 cm lungime, iar unele celule nervoase motoare din măduva spinării pot avea un diametru de 150—200 μ.

Mărimea celulelor nu este în raport direct cu dimensiunile animalului; cele mai mari celule le găsim la larve, iar cele mai mici la animalele superioare.

Scanned with OKEN Scanner

6.1.2. COMPOZIȚIA CHIMICĂ A CELULELOR

Analiza chimică arată că în celule există elementele care se află și în mediul înconjurător.

Elementele care intră în compoziția chimică a organismului aparțin primelor trei perioade ale sistemului periodic, în următoarea proporție:

Perioada I și a II-a (H, C, N, O)	96,1 %
Perioada a III-a (Na, Mg, P, S, Cl)	1,7 %
Alte elemente	2,2 %
	100,00 %

Conținutul în elemente pentru un organism de 70 kg s-ar putea exprima astfel: oxigen — 44 kg, carbon — 14 kg, hidrogen — 7 kg, azot — 2,1 kg, calciu — 1 kg, fosfor — 0,7 kg, potasiu — 0,17 kg, sulf — 0,14 kg, clor — 0,07 kg, sodiu — 0,07 kg, magneziu — 0,03 kg, fier — 0,006 kg, zinc — 0,002 kg, cupru — 0,003 kg, mangan — 0,0003 kg, iod — 0,00003 kg.

Compoziția chimică este diferită de la un organ sau țesut, la altul. Tabelul 21 redă compoziția aproximativă a unor țesuturi și organe.

TABELUL 21

Compoziția chimică aproximativă a unor țesuturi animale (%)

Compusul	Țesutul					
	mușchi striat	sînge	ficat	creier	piele	os
Apă	72—78	79	60—80	78—85	66—70	20—25
Substanțe solide	22—28	21	20—40	22	34	75—80
Proteine	18—20	19	15	8	25	30
Lipide	3	1	3—20	12—15	7	cantități mici
Glucide	0,6	0,1	1—15	0,1	prezente	prezente
Extract organic	1	0,14	prezent	1—2	prezent	cantități mici
Extract anorganic	1	0,9	—	1	0,6	45

Un organism de 70 kg conține aproximativ 10,3 kg proteine, care se găsesc în cea mai mare cantitate în celule sub formă de sol sau gel, conferind starea coloidală, fin dispersată, în care se petrece majoritatea reacțiilor biochimice; glucidele, în formă liberă sau în combinație cu proteinele, sînt în cantitate de 0,2 kg, în timp ce lipidele simple, complexe și asociate cu proteinele se găsesc în cantitate de 8,35 kg.

Apa este mediul fundamental în care au loc toate reacțiile biochimice și fenomenele fizico-chimice. La animalele superioare ea reprezintă aproximativ 60—95% din compoziția celulei, iar în unele celule poate să ajungă pînă la 98% din greutatea lor totală; conținutul în apă al țesuturilor variază în funcție de activitatea metabolică: creier — 84%, rinichi —81%, suprarenale — 80%, inimă — 79%, plămîni — 78%, splină — 77%, mușchi — 75%, stomac, intestin — 75%, ficat — 74%, pancreas — 73%, piele — 70 %, țesut adipos — 30%, os — 22%, dentină — 10%.

Scanned with OKEN Scanner

Datorită structurii sale moleculare simetrice, în care fiecare atom de oxigen se află în centrul unui tetraedru, apa are o serie de proprietăţi fizico-chimice propice vieţii :

— capacitate calorică mare, proprietate care face ca apa să-şi păstreze timp îndelungat temperatura constantă, utilă proceselor metabolice ;

— căldură specifică mare şi aproape constantă între + 27° şi +40°C ;

— capacitate de disociere în ioni de hidrogen şi hidroxil ($HOH \rightleftharpoons H^+ + OH^-$), proprietate prin care intervine în reacţiile de oxido-reducere celulară precum şi în reacţiile de tamponare a mediului ;

— rol structural şi funcţional în procesele metabolice, la temperatura de 27°—40°C aflîndu-se sub formă de trimer şi tetramer ;

— este un excelent solvent pentru foarte mulţi compuşi organici, deoarece prin polaritatea ei şi prin legăturile de hidrogen asigură dizolvarea compuşilor cu funcţii hidroxil, carboxil, carbonil şi amine, fiind în acelaşi timp capabilă să dizolve multe săruri ;

—ajută la disocierea electroliţilor slabi, constituenţi ai mediului celular (carboxilul şi aminele sînt cei mai frecvenţi electroliţi slabi din citoplasmă).

În celulă apa se prezintă sub două stări : *apă liberă* şi *apă de constituţie*. Apa liberă în care sînt dizolvate diferite săruri se găseşte în circulaţie (sînge sau limfă) ; ionizarea ei înlesneşte reacţiile care au loc în materia vie.

Apa de constituţie este puternic fixată în structura substanţelor coloidale şi prezintă proprietăţi diferite faţă de apa liberă în ceea ce priveşte tensiunea superficială şi congelarea. Astfel, deshidratarea unui coloid este aproape imposibilă, chiar la temperaturi înalte, fără distrugerea structurii lui micelare ; aşa se explică rezistenţa la deshidratare a plantelor şi animalelor în regiunile de deşert.

Sărurile minerale se găsesc fie dizolvate în apa celulei, fie în combinaţii complexe cu proteinele, formînd complecşii proteici din constituţia citoplasmei. Aşa sînt unele sisteme enzimatice sau anumiţi complecşi ca : hemoglobină (Fe), vitamina B_{12} (Co) sau clorofila plantelor (Mg).

Sărurile minerale absorbite pe suprafaţa miceliilor coloidale determină încărcarea lor electrică ; în felul acesta, ele participă în mod activ la dinamica materiei vii.

6.1.3. ULTRASTRUCTURA CITOPLASMEI

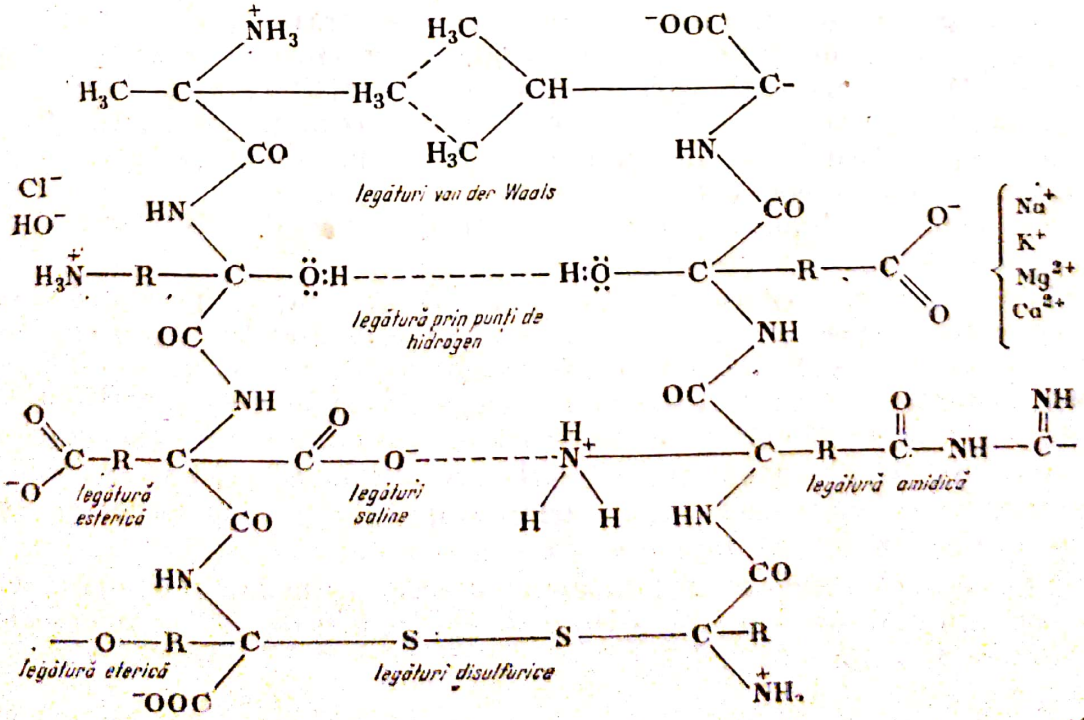
Masa totală, extranucleară a celulei, incoloră, de natură coloidală, elastică, deformabilă, contractilă, cu aspect omogen sau granular, constituie *citoplasma*. La organismele tinere reacţia citoplasmei este alcalină ; pe măsura înaintării în vîrstă reacţia devine acidă.

Citoplasma constituie substanţa activă a celulei, fiind sediul marii majorităţi a sistemelor enzimatice sub influenţa cărora au loc manifestările caracteristice vieţii. În interiorul citoplasmei apar formaţiunile subcelulare, unele adaptate diferitelor funcţii legate de manifestările specifice ale dinamicii celulare, sau în raport cu proprietăţile secretoare, altele adaptate funcţiei de excreţie. Aceste formaţiuni diferenţiate din masa citoplasmatică, numite incluziuni permanente sau *organite*, sînt următoarele : aparatul G o l g i, reticulul endoplasmic, condriomul, mitocondriile, lizozomii, microzomii, ribozomii (fig. 35).

Scanned with OKEN Scanner

Fig. 35. Structura celulei : membrana celulară (1), nucleul (2), nucleolii (3), mitocondriile (4), lizozomii (5), reticulul endoplasmatic (6), ribozomii (7).

Cercetările chimice şi roentgenografice au arătat că în interiorul citoplasmei lanţurile macromoleculelor proteice sînt unite prin legături chimice de tip electrovalent, covalent, punţi disulfurice, legături v a n d e r W a a l s şi legături de hidrogen ca în schema următoare :



Între agregatele proteice macromoleculare se realizează alte legături, constituindu-se micelele. Protoplasma celulelor apare astfel ca o rețea continuă care formează scheletul intracelular (citoscheletul). Ionii de hidrogen și electroliții au rol important, ei participînd atît la formarea legăturilor menționate, cît și la crearea cîmpurilor electrice, contribuind astfel la menținerea și consolidarea citoscheletului.

Citoscheletul se află într-o permanentă relație cu mediul înconjurător, prin funcțiile sale, contribuind, la asigurarea caracterelor specifice, care deosebesc între ele ființele, organele, țesuturile și celulele.

Ultrastructura constituie armătura proteică macromoleculară a protoplasmei, care asigură, prin diferitele și numeroasele lanțuri laterale de aminoacizi, manifestările morfologice celulare și desfășurarea armonioasă, coordonată și concomitentă a multiplelor reacții biochimice, enzimatice, de oxidoreducere, de analiză și sinteză, de excreție și secreție care se petrec la nivelul celulelor vii. Microeterogenitatea acestei structuri alcătuite din lanțuri polipeptidice este într-o perpetuă transformare, prin ruperea și înnodarea necontenită a legăturilor, în căutarea unui echilibru dinamic, pe care materia vie nu-l găsește niciodată.

6.1.4. ORGANITELE CELULARE. STRUCTURA ȘI FUNCȚIA LOR

6.1.4.1. *Mitocondriile* au fost identificate la începutul secolului XX în toate celulele animale; ele au aspect filamentos sau granulos, stabilit cu ajutorul colorantului vital verde J a n u s.

Structura mitocondriei a fost studiată cu ajutorul microscopului electronic de către P a l a d e, G r e e n, P o r t e r și alții. Formată dintr-un complex fosfolipoproteic, mitocondria din celulele hepatice are lungimea de 2 μ, diametrul de 0,5 μ și volumul de aproximativ 0,8 μ^3. În exterior este delimitată de o membrană formată din trei straturi, iar în interior de o serie de membrane stratificate, denumite *septe* sau *cristae mitocondriale* (fig. 36). Membrana exterioară conține 65% proteine și 35% fosfolipide. Pe suprafața acesteia se află un complex polienzimatic care participă la transportul electronilor și la fosforilarea oxidativă. S-a constatat că acest complex este foarte bogat în citocromi și alte substanțe neheminice cu fier, ceea ce permite îndeplinirea funcției de transportori de electroni (ETP = = *electron transports particles*).

Din punct de vedere structural, aceste complexe lipoproteice sînt formațiuni cu aspect sferic, avînd un diametru de 100 Å și masa cuprinsă între $4 \cdot 10^5$ și $1{,}3 \cdot 10^6$ daltoni. Pe lîngă citocromi, mai conțin și alte sisteme enzimatice de oxidoreducere și ioni metalici bivalenți (Ca^{2+}, Mn^{2+}, Cu^{2+}, Mg^{2+}) și participă direct la procesele de contracție mitocondrială. Aceste complexe sînt denumite și *translocaze* (G r e e n) datorită faptului că la nivelul lor se pot realiza transferuri mari de energie de la un sistem enzimatic la altul, într-un timp relativ scurt.

Se crede că însuși ritmul cardiac, în seria animală, în diferite stări normale sau patologice, depinde de numărul ETP și de cristaele prezente în mitocondria din miocard.

Scanned with OKEN Scanner

Din punct de vedere funcţional, membrana mitocondrială se comportă ca un sistem reversibil şi selectiv, cea exterioară fiind permeabilă pentru unele elemente, iar cea interioară pentru altele. Datorită acestei

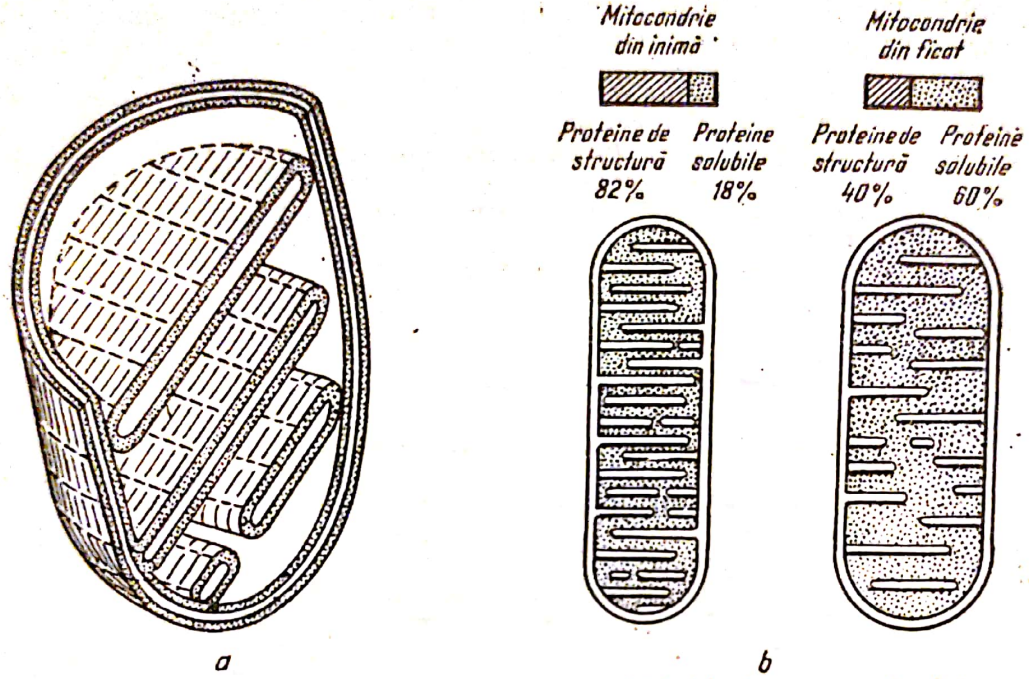


Fig. 36. Structura tridimensională a mitocondriei (*a*) şi comparaţie între structura mitocondriei din inimă şi cea din ficat (*b*).

comportări selective apare fenomenul de umflare reversibilă a mitocondriei (*swelling*), care funcţionează ca un sistem contractil reversibil, la acţiunea ATP, tiroxinei, ionilor metalici, glutationului etc.

Mecanismul prin care se realizează contracţia şi relaxarea membranei mitocondriale constă în legarea şi desfacerea moleculelor de apă la diferiţi compuşi. Astfel, 60 μM ATP leagă aproximativ 650 μM de apă, cu modificări mari de volum. Ansamblul de enzime care iau parte la acest mecanism poartă denumirea de *mecanoenzime* şi sînt capabile să producă schimbări în configuraţia moleculară a membranei, influenţîndu-i permeabilitatea.

Dacă admitem că pe membrana mitocondrială are loc cuplarea respiraţiei cu fosforilarea oxidativă, în momentul cînd această structură este deformată, de exemplu sub acţiunea tiroxinei, se va produce prin intermediul mecanoenzimelor o decuplare între cele două mecanisme, ceea ce va duce la o dereglare funcţională. Această dereglare funcţională are o simptomatologie clinică bine precizată în cazul hiperfuncţiei tiroidiene şi este condiţionată de o serie de leziuni moleculare produse de excesul de tiroxină.

Din punct de vedere biochimic, mitocondriile îndeplinesc funcţia de aşa-zisă centrală energetică celulară, fiind sediul structurat al proceselor redox. Procesul poartă şi numele impropriu de respiraţie celulară. Datorită rolului important pe care îl au în metabolismul intermediar, numărul mitocondriilor dintr-o celulă variază în funcţie de ţesut şi organism. Astfel, o celulă hepatică poate să conţină între 500 şi 2 000 de mitocondrii;

în tumori, numărul lor scade la jumătate. În unele amibe gigante s-au găsit pînă la 5 000, în ou de ursin între 33 000 și 150 000, reprezentînd aproximativ 20% din masa totală a fiecărei celule normale.

Rolul major al mitocondriilor, indiferent de originea lor, este de a participa la eliberarea energiei potențiale din substanțele organice și de a o pune la dispoziția celulei (fig. 37).

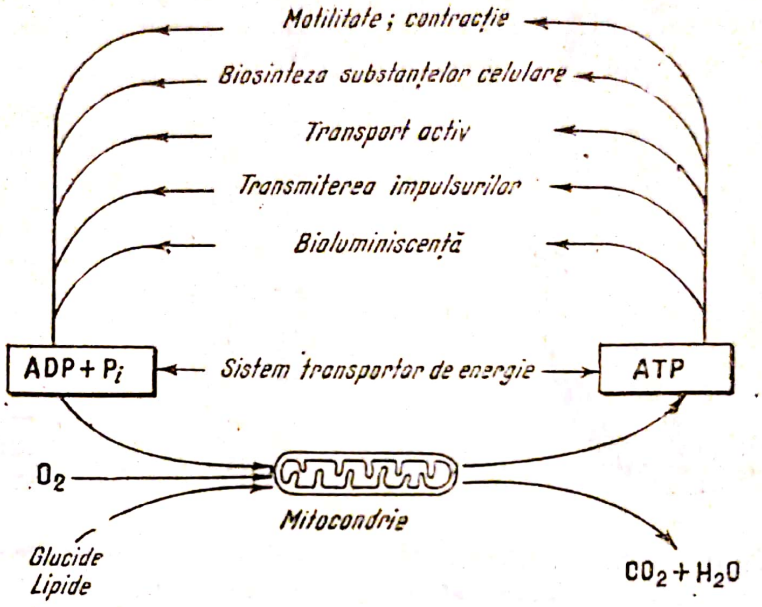


Fig. 37. Rolul central al mitocondriei în convertirea energiei.

Această funcție se realizează pe următoarele căi :
— ciclul acidului citric sau ciclul K r e b s ;
— transferul de hidrogen și electroni ;
— fosforilarea oxidativă, care asigură refacerea ATP în strînsă legătură cu celelalte două procese de mai sus.

6.1.4.2. *Lizozomii* sînt formațiuni sferice cu diametrul de 0,4 μ și densitatea 1,15 g/ml, care depun după separarea clasică a mitocondriilor din omogenatul de ficat, la 25 000 × g (g = accelerația gravitațională). Această fracțiune este bogată în sisteme enzimatice cu rol în hidroliza intracelulară.

Dintre sistemele enzimatice din clasa hidrolazelor care se găsesc în lizozomi se menționează fosfataza acidă, proteaze din clasa catepsinelor, ribonucleaza, dezoxiribonucleaza, β-glucuronidaza și arilsulfataza (fig. 38). Conținutul crescut în enzime hidrolitice al acestor formațiuni arată participarea lor la procesele de *autoliză*, *pinocitoză* și *fagocitoză celulară*. Eliberarea sistemelor enzimatice din interiorul lizozomului se face atît prin difuziune, cît și prin dezorganizarea membranei sub acțiunea unor agenți fizici sau chimici, cînd enzimele trec integral în citoplasma celulară.

In vitro, distrugerea membranei se poate face cu ajutorul detergenților, ultrasunetelor, radiațiilor ionizante, al peroxizilor și hidroperoxizilor.

Scanned with OKEN Scanner

Folosind LAHPO sub forma de sare de sodiu, C ă p â l n ă a reuşit să obţină o dezorganizare a membranei lizozomului, comparabilă cu cea realizată prin ultrasonice şi radiaţii ionizante. Efectul hidroxi-peroxizilor asupra membranei lizozomilor a fost apreciat prin măsurarea activităţii arilsulfatazei libere şi totale.

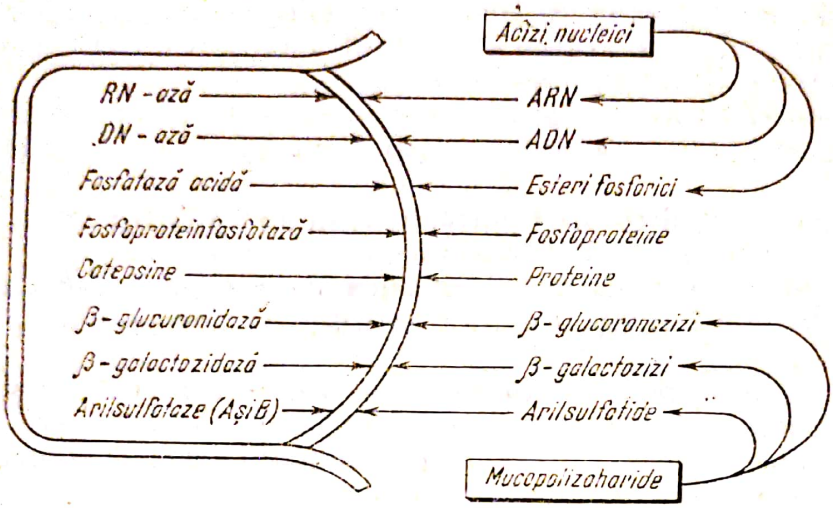


Fig. 38. Funcţia lizozomului.

Mecanismele de homeostazie care acţionează la nivelul subcelular şi controlează accesibilitatea substanţelor de constituţie sugerează şi posibilitatea intervenţiei lizozomilor în autoreglarea metabolismului celulei, prin influenţarea permeabilităţii de membrană. Analiza histochimică a activităţii neuroproteazelor, în variate condiţii de *stress*, a permis evidenţierea unei corelaţii între intensitatea factorilor de agresiune şi eliberarea de enzime din lizozomi.

6.1.4.3. *Reticulul endoplasmic* face parte din citoplasma celulară, ca fracţiune a complexului structural celular (P a l a d e, P o r t e r).

Endoreticulul, care apare ca un sistem de canalicule ramificate mărginite de membrane, are o formă cilindrică, diametrul între 0,1 şi 0,2 μ şi lungimea de 4 μ.

Rolul lui este de a delimita două faze intracelulare, aceea de sol de cea de gel.

Cel mai important rol îl are în sinteza şi transportul intracelular al proteinelor, în diferenţierea şi funcţia celulară. Ori, *mitoza* şi *diferenţierea celulară* sînt legate nemijlocit de sinteza de proteine, în care reticulul endoplasmic şi componenţii săi (*microzomii* şi *ribozomii*) intervin direct (S i e k e v i t z, P a l a d e). Tot în reticul s-au găsit concentraţii mari de glucozo-6-fosfatază, citocromreductază şi ribonuclează.

Alte mecanisme biochimice celulare în care această formaţiune poate constitui suportul structural par a fi : biosinteza lipidelor, a unor hormoni steroizi (testosteron şi progesteron), fenomenul de transformare a energiei radiante luminoase în energie nervoasă prin intermediul fotoreceptorilor retinieni, în procesul de contractilitate a fibrelor musculare etc.

Microzomii sînt fracţiuni complexe mai mici decît lizozomii. Ei pot fi separaţi prin distrugerea reticulului endoplasmic. Sedimentează prin ultra-

centrifugare, la 108 000 ×g. Din punct de vedere structural sînt bogați în lipide, proteine și mai ales în ARN, îndeplinind un rol coordonator în biosinteza proteinelor.

6.1.4.4. *Ribozomii* au fost descoperiți de către P a l a d e (1953), care a remarcat la celulele cu capacitate de înmulțire rapidă unele particule distincte de microzomi, foarte bogate în ARN. Pentru a putea fi diferențiate de microzomi, în vederea evitării unor confuzii semantice, au fost denumite ribozomi. Din punct de vedere structural, conțin 40—60% acid nucleic înalt polimerizat și 50% proteine.

Ribozomii se găsesc fie localizați în interiorul veziculelor microzomale atașate de membrana reticulului endoplasmic, fie liberi în citoplasma celulară.

Rolul principal al ribozomilor constă în participarea lor la biosinteza proteinelor, alături de celelalte formațiuni amintite.

În ultimii ani s-a acceptat noțiunea de *polizomi* (*poliribozomi*) sau *ergozomi*, care ar fi formați dintr-un complex de ribozomi atașați la molecula de ARN_m.

6.1.4.5. *Nucleul* poate să fie sferic, așezat în centrul celulei sau poate fi excentric; uneori poate ocupa toată celula. Mărimea lui este de aproximativ 12 μ, reprezentînd 1/4 sau 1/3 din volumul total al celulei, fiind mai mare în celulele tinere decît în cele adulte.

Între masa nucleului și masa citoplasmatică există totdeauna așa-numitul raport nucleo-citoplasmatic, raport care stabilește între ele un echilibru dinamic binedeterminat, cu caracter invariabil.

Procesele de diviziune celulară sînt induse de nucleu, unde acizii nucleici, constituiți în cromozomi, dirijează mecanismul mitozei. ADN este purtătorul informației ereditare (ca gene) și se găsește în nucleu în cantitatea cea mai mare. Studiul citofotometric al unor celule a arătat existența diferitelor categorii de nuclei (diploid, tetraploid și octoploid) a căror compoziție în ADN este diferită. ARN se află în cantitate mai mică și este localizat în *nucleol*. Cantitatea ARN variază cu specia și cu starea funcțională a organismului, existînd un raport de transformare între ARN și ADN.

ADN și ARN din nucleu sînt conjugați cu proteine. Proteinele nucleare sînt solubile în soluții saline diluate și fac parte din clasa histonelor, avînd un caracter bazic.

6.1.4.6. *Membrana celulară și transportul activ prin membrană* joacă un rol deosebit în organizarea celulară. La nivelul de contact dintre citoplasmă și mediul înconjurător se formează, prin condensarea și asocierea substanțelor tensioactive, în primul rînd lipoproteine, o stare fizico-chimică specială, membrana poroasă, un plasmogel, la suprafața căruia se petrec fenomene electrostatice, de difuziune, osmoză și contraosmoză, ce fac posibile schimburile dintre mediu și celulă. Aici au loc mai ales o serie de procese energetice și enzimatice, care controlează schimbul de substanțe între mediul exterior și interiorul celulei. Membrana se prezintă ca o formațiune cu o structură bine precizată pentru fiecare tip de celulă și cu proprietăți caracteristice, selective, în funcție și de echipamentul său enzimatic.

Concepția clasică cu privire la modelul structural al membranei consideră că aceasta are grosimea de 75 Å și este formată din două straturi proteice, dense, cu grosimea de 25 Å și unul mai puțin dens, lipidic, tot de

Scanned with OKEN Scanner

25 Å. Această concepţie nu este însă general valabilă şi desigur că există variaţii de dimensiune şi compoziţie la diferite membrane.

Se apreciază că la celulele din structura ţesuturilor, componentele membranare principale, lipide, proteine, glucide, au timpul de înjumătăţire şi refacere de aproximativ 100 de ore. În general, membranele conţin 60 % proteine şi 40 % fosfolipide. Biochimia modernă priveşte membrana ca incluzînd un sistem complex polienzimatic, în relaţie dinamică cu mediul exterior şi cel intracelular, asigurînd în acest mod totalitatea manifestărilor funcţionale celulare.

Multe din sistemele enzimatice intracelulare îşi exercită acţiunea începînd cu membrana celulară (trecerea prin membrană a substanţelor organice şi anorganice, desfăşurarea reacţiilor redox, convertirea unor forme de energie în alte forme etc.).

Principalii compuşi chimici întîlniţi în structura membranelor sînt redaţi în figura 39. Se pot distinge proteinele, ionii metalici, ionii fosfat intercalaţi în porii structurii macromoleculare împreună cu unele glicoproteine, colesterolul şi complexele lipidice, care formează cea mai mare parte din structura membranei (45 Å) şi care imprimă caracterul hidrofob al acesteia.

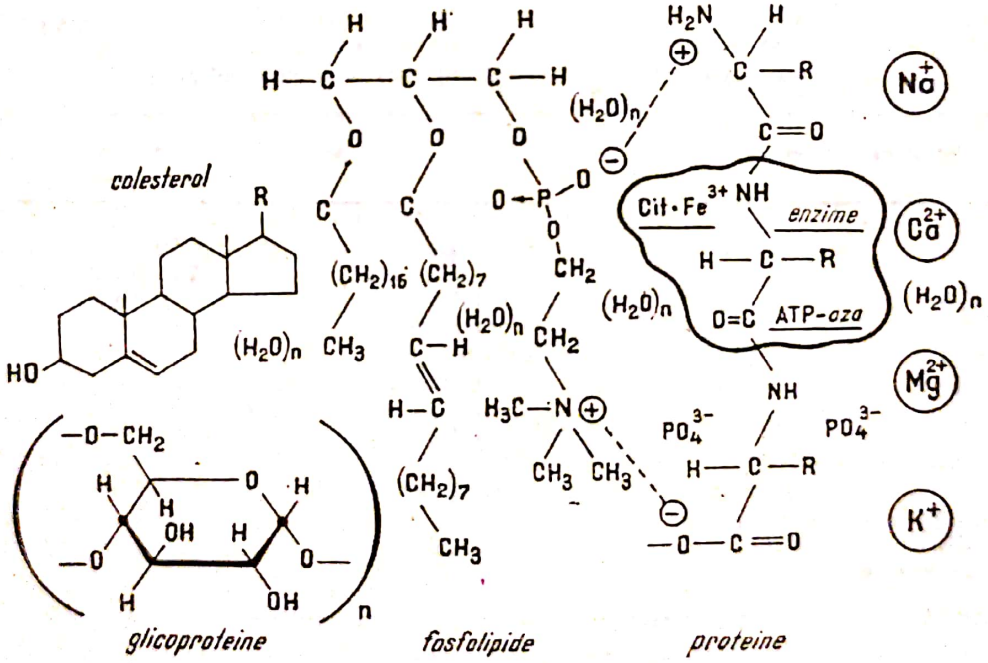


Fig. 39. Principalii compuşi chimici din membranele celulare.

Procesul de trecere a substanţelor prin membrana celulară este supus unor factori multipli, nefiind în majoritatea cazurilor un simplu fenomen de difuziune, aşa cum se întîmplă în cazul membranelor semipermeabile inerte. Trecerea prin membrană este condiţionată de următorii parametri mai importanţi :

— schimbarea continuă a gradientului de concentraţie a substanţelor din mediul exterior şi cel interior celular, ca o consecinţă a desfăşurării reacţiilor metabolice ;

Scanned with OKEN Scanner

— stereospecificitatea substanţelor care sînt solicitate în procesul de metabolism şi care sînt activate în vederea trecerii barierei celulare de către sistemele enzimatice specifice;

— acţiunea activatorilor şi inhibitorilor proceselor enzimatice care au loc la nivelul membranei celulare în timpul trecerii substanţelor spre interiorul celulei.

Dintre aceşti parametri, importantă din punct de vedere biochimic este stereospecificitatea, aceasta fiind corelată şi cu procesele enzimatice, implicit cu acţiunea activatorilor şi inhibitorilor. Selectivitatea în pătrunderea după caz a formelor *L* sau *D* (naturale) se datoreşte sistemelor enzimatice specifice, care catalizează procesul activ de permeabilitate celulară. Începînd cu moleculele simple de apă şi săruri şi terminînd cu substanţele complexe (glucide, aminoacizi, acizi graşi, vitamine, hormoni, medicamente etc.), pentru ca să pătrundă în celulă, toate trebuie să învingă o barieră energetică activă care s-a creat între celulă şi mediul ambiant. Din acest motiv se exercită un control continuu asupra substanţelor care intră în celulă, în ceea ce priveşte cantitatea, calitatea şi momentul metabolic al pătrunderii lor. Tabelul 22 redă compoziţia chimică a spaţiului extra- şi intracelular.

TABELUL 22

Compoziţia chimică a spaţiului extra- şi intracelular

Elemente şi compuşi chimici	Lichidul extracelular	Lichidul intracelular
Na^+	142 mEq/l	10 mEq/l
K^+	5 mEq/l	141 mEq/l
Ca^{2+}	5 mEq/l	1 mEq/l
Mg^{2+}	3 mEq/l	58 mEq/l
Cl^-	103 mEq/l	4 mEq/l
HCO_3^-	28 mEq/l	10 mEq/l
PO_4^{3-}	4 mEq/l	75 mEq/l
SO_4^{2-}	1 mEq/l	2 mEq/l
Glucoză	90 mg%	0 — 20 mg%
Aminoacizi	30 mg%	200 mg%
Colesterol	—	—
Fosfolipide	0,5 mg%	2 — 95 g%
Lipide neutre	—	—

Ipoteza chimiosmotică a lui Mitchell, privind conjugarea mai multor procese biochimice în procesul de permeabilitate de membrană, este destul de discutată. Procesul chimiosmotic este conceput pe baza următoarelor postulate:

— sistemul reversibil de translocaţie protonică a ATP-azei;

— translocaţia protonică din lanţul reacţiilor de oxidoreducere;

— sistemul de schimb prin difuziune cuplat cu translocaţia protonică dată de anioni şi cationi;

— cuplul de ioni impermeabili prin membrană, de care sînt legate cele trei sisteme anterioare.

Scanned with OKEN Scanner

6.2. PRODUCEREA, STOCAREA ŞI UTILIZAREA ENERGIEI ÎN CELULE

6.2.1. NOŢIUNI DE TERMODINAMICĂ CHIMICĂ

În orice moment, în fiecare celulă, au loc atît procese catabolice, cît şi procese anabolice. În catabolism, graţie reacţiilor de oxidare, moleculele organice cu înalt grad de organizare şi deci cu energie potenţială ridicată (glicogen, glucoză, acizi graşi, proteine etc.), sînt transformate în molecule mici ca CO_2 şi H_2O, cu energie potenţială scăzută. Energia liberă care se produce în aceste reacţii de degradare este utilizată în reacţiile de sinteză, precum şi în procesele de transport, contracţie şi altele, care sînt consumatoare de energie.

Transferul energiei eliberate în reacţiile de oxidare spre reacţiile de sinteză nu are loc în mod direct; energia este conservată sub formă de energie chimică în legături chimice numite *legături macroergice.*

Termodinamica chimică poate fi aplicată reacţiilor de producere şi utilizare a energiei în celule. Principiile termodinamice au deplină valabilitate numai în cazuri particulare, respectiv a reacţiilor enzimatice individuale, care pot fi considerate sisteme închise. O celulă în ansamblu nu constituie un sistem închis, celula schimbînd materie cu exteriorul; pentru caracterizarea energetică a celulelor, organelor şi organismelor vii în întregime s-a dezvoltat în ultimii ani termodinamica sistemelor deschise.

Prima lege a termodinamicii statuează că, în orice proces, energia totală a sistemului studiat şi a mediului rămîn constante. Diferire forme de energie se pot transforma reciproc, respectîndu-se echivalenţele stabilite de fizică, energia neputînd nici să dispară, nici să fie creată.

Legea a doua a termodinamicii stabileşte direcţia în care decurg procesele fizice şi chimice: procesele evoluează astfel încît entropia totală a sistemului şi a mediului, considerate în ansamblu, să crească. Se precizează faptul că, din punct de vedere macroscopic sau fenomenologic, entropia este legată de schimbările de căldură dintre sistem şi exterior, iar din punct de vedere microscopic, al alcătuirii atomo-moleculare, ea exprimă gradul de ordonare a sistemului, o valoare mare a entropiei corespunzînd unui sistem dezordonat.

În cazul reacţiilor biochimice procesele sînt izobare, adică au loc la presiunea atmosferică constantă. În aceste condiţii, variaţia energiei interne, măsurabilă experimental pe cale calorimetrică, sub forma căldurii degajate sau absorbite, se numeşte variaţie a entalpiei sistemului $\Delta H = \Delta Q_p$ şi constă din doi termeni:

$$\Delta H = \Delta G + T\Delta S$$

unde ΔG este variaţia energiei libere (acea parte de energie care poate fi transformată în lucru la temperatură şi presiuni constante), T — temperatura absolută, iar ΔS — variaţia entropiei sistemului. Termenul $T\Delta S$ exprimă variaţia energiei legate a sistemului, adică a acelei părţi din energia internă care nu poate fi transformată într-o formă oarecare de travaliu

util (mecanic, electric, chimic etc.), ci rămîne numai sub formă de căldură.

Din relaţia de mai sus, variaţia energiei libere este :

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

După atingerea echilibrului, reacţiile chimice şi biochimice nu mai pot furniza energia utilă, deci la echilibru $\Delta G = 0$. Introducînd această condiţie în ecuaţia :

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln K_{ech}$$

care leagă variaţia energiei libere de variaţia energiei libere standard (ΔG°) şi de constanta de echilibru (K_{ech}), (R fiind constanta generală a gazelor), se obţine :

$$\Delta G^\circ = - RT \ln K_{ech}$$

ΔG° reprezintă diferenţa între energia liberă a reactanţilor şi a produşilor de reacţie.

Judecate prin prisma ultimei ecuaţii, reacţiile chimice se împart în reacţii exergonice, pentru care ΔG° are valoare negativă, şi endergonice, pentru care ΔG° are valoare pozitivă.

Reamintim că pentru o reacţie :

$$A + B \rightleftharpoons C + D$$

valoarea K_{ech} este dată de relaţia :

$$K_{ech} = \frac{[C] \cdot [D]}{[A] \cdot [B]},$$

adică de produsul la echilibru al concentraţiei produşilor de reacţie raportat la produsul concentraţiei reactanţilor ; rezultă că determinînd pe o cale oarecare aceste concentraţii, valoarea lui ΔG° poate fi calculată uşor. În cazul reacţiilor biochimice, pentru care s-a adoptat pH-ul standard 7, ΔG° se calculează şi se exprimă pentru acest pH. În tabelul 23 se dau va-

TABELUL 23

Energiile libere ale reacţiilor de hidroliză pentru ATP, ADP, AMP, comparativ cu energia liberă a altor reacţii biochimice

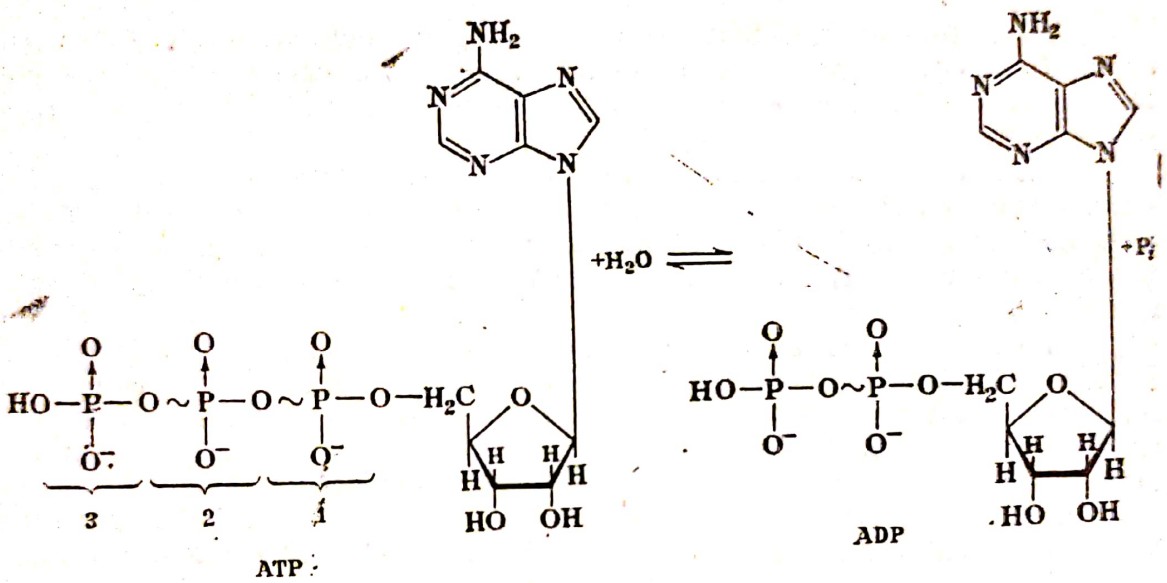
Reacţia	(Kcal/mol)
$ATP + H_2O \rightleftarrows ADP + P_i$	−7,3
$ATP + H_2O \rightleftarrows AMP + PP_i$	−7,3
$AMP + H_2O \rightleftarrows A + P_i$	−5,4
zaharoză + $H_2O \rightleftarrows$ glucoză + fructoză	−7,0
G-1-P $\rightleftarrows$ G-6-P	−1,7
G-6-P $\rightleftarrows$ F-6-P	+0,4
F-1,6-P $\rightleftarrows$ dihidroxiacetonfosfat + gliceraldehid-3-fosfat	+5,7

Scanned with OKEN Scanner

lorile lui ΔG° pentru cîteva reacţii biochimice importante, la temperatura de 25°C.

6.2.2. RIBONUCLEOTIDTRIFOSFAŢII ÎN CALITATE DE COMPUŞI MACROERGICI

Reacţia de hidroliză a ATP cu eliberarea de ADP şi acid fosforic poate fi scrisă :



Întrucît prin hidroliza legăturii dintre grupările fosfat 2 şi 3 are loc o variaţie însemnată de energie liberă standard (—7,3 kcal/mol), aceasta constituie o legătură macroergică şi se notează prin simbolul ~. Tot legătură macroergică este şi aceea dintre grupările fosfat 1 şi 2, la hidroliza căreia are loc aceeaşi variaţie a energiei libere standard. Este evident că reacţia inversă de formare a ATP din ADP şi P_i va avea loc cu aceeaşi variaţie a ΔG°, aceasta avînd însă semnul pozitiv (energia reactanţilor mai mică decît a produşilor).

Imediat după descoperirea ATP (1929) s-a conturat faptul că acesta, prin posibilitatea lui de a elibera energie în cursul hidrolizei şi de a prelua energie din mediu în reacţia inversă, este implicat în energetica reacţiilor biochimice. Confirmarea acestor presupuneri s-a făcut în următorii 10—15 ani cînd s-a stabilit că ATP, ADP şi AMP (rezultat în reacţia ATP + $+ H_2O \rightleftharpoons$ AMP + PP_i) se găsesc în absolut toate celulele şi că pentru o specie de celule suma concentraţiei acestor trei compuşi este constantă, raportul lor diferind după starea metabolică a celulelor. Mai mult, adaosul unui extract celular cu un anumit raport ATP/ADP la mediul în care se desfăşoară o reacţie biochimică cu ΔG° pozitiv, conduce la scăderea raportului ATP/ADP.

În reacţiile chimice din celule în care ATP este furnizor de energie, transferul acesteia se face simultan cu transferul grupării fosfat, fapt care exclude necesitatea hidrolizei ATP, reacţia de hidroliză servind numai pentru

aprecierea ordinului de mărime al variației energiei libere. De exemplu, mobilizarea glucozei pentru reacțiile implicate în glicoliză se face prin reacția directă a glucozei cu ATP :

$$\alpha\text{-}D\text{-glucoză} + \text{ATP} \xrightarrow{Mg^{2+}} \alpha\text{-}D\text{-glucozo-6-fosfat} + \text{ADP}$$

Pe de altă parte, formarea ATP în celule are loc prin transferul direct al acidului fosforic de pe un compus fosforilat pe ADP, de exemplu :

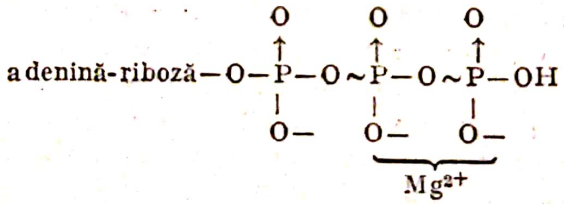
$$\text{acid 1,3-difosfoglicerlc} + \text{ADP} \rightleftharpoons \text{acid 3-fosfoglicerlc} + \text{ATP}$$

ATP-ul format în numeroase reacții de genul celei de mai sus servește ca un fond comun atît pentru realizarea reacțiilor care necesită energie, cît și pentru alte procese cum ar fi de exemplu transportul prin membrane etc.

Se apreciază că organismul unui adult produce zilnic circa 70 kg ATP, consumînd evident aceeași cantitate. Dealtfel, există un control riguros, prin mecanisme moleculare, al producerii ATP, ceea ce asigură necesitățile de consum în orice stare metabolică (v. Biosinteza nucleotidelor purinice).

V a s i l e s c u și T r u ț i a au studiat în Laboratorul de biofizică al I.M.F. București dinamica ATP în nerv în timpul excitației. Consumul de ATP este mult crescut în condițiile înlocuirii soluției R i n g e r realizată în H_2O cu soluție R i n g e r realizată în D_2O ; aceste rezultate evidențiază și rolul deosebit al protonilor în procesele de excitație.

În celule, la pH = 7, ATP și ADP sînt puternic ionizați (ATP avînd 4 sarcini negative, iar ADP 3). Prezența în concentrație mare a ionilor de Mg^{2+} face ca la acest nivel ATP și ADP să se afle sub forma de complecși de tipul :



forma complexată fiind forma activă.

Sub acțiunea unor enzime, numite nucleoziddifosfokinaze, ATP poate transfera acidul fosforic ribonucleotiddifosfaților uridilici, citidilici și guanilici, în reacții de tipul :

$$\text{ATP} + \text{XDP} \rightleftharpoons \text{ADP} + \text{XTP}$$

unde X poate fi deci uridină, citidină sau guanozină. UTP, CTP și GTP astfel formați servesc nu numai în calitate de monomeri pentru sinteza ARN, ci și în calitate de compuși macroergici. Astfel, UTP transferă gruparea fosfat și deci energie unor compuși în vederea sintezei de polizaharide. În mod similar CTP este donor de energie într-o serie de reacții din căile de biosinteză ale lipidelor, iar GTP este furnizor de energie în unele reacții din anabolismul proteic.

Scanned with OKEN Scanner

Valorile lui ΔG° pentru reacțiile de hidroliză ale tuturor compușilor fosforilați sînt negative. Comparativ cu ΔG° a hidrolizei ATP, acestea sînt mai mari sau mai mici (tab. 24).

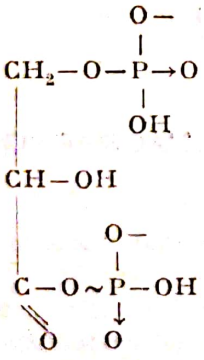
TABELUL 24

Energia liberă standard a hidrolizei unor compuși fosforilați

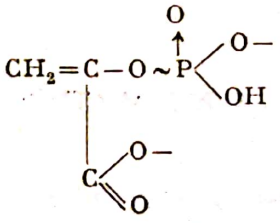
Compusul	(Kcal/mol)
PEP	−14,8
1,3-difosfoglicerat	−11,8
Fosfocreatină	−10,3
Acetilfosfat	−10,1
Fosfoarginină	− 7,7
ATP	− 7,3
G-1-P	− 5,0
F-6-P	− 3,8
G-6-P	− 3,3
Glicerol-1-fosfat	− 2,2

Compușii fosforilați cu ΔG° mai mare decît a ATP se pot subdivide în două categorii :

a) compuși fosforilați rezultați în reacții enzimatice de degradare a principiilor alimentare, dintre care cei mai importanți sînt acidul **1, 3**-difosfogliceric și PEP :

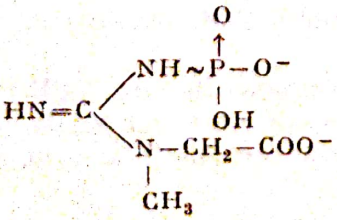


acid 1,3-difosfogliceric

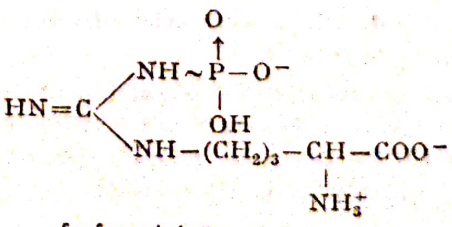


PEP

b) compuși fosforilați cu rol de rezervor de legături macroergice, purtînd denumirea generală de *fosfageni*; dintre aceștia mai importanți sînt fosfocreatina și fosfoarginina :



fosfocreatină
(acid metilguanidinacetic)



fosfoarginină

Fosfocreatina și fosfoarginina, în care legătura macroergică se stabilește între atomul de azot și radicalul de acid fosforic, se formează între creatină sau arginină și ATP în prezența creatinfosfokinazei, respectiv argininfosfokinazei. Fosfocreatina este principalul rezervor de legături macroergice la vertebrate, în timp ce fosfoarginina este rezervorul la nevertebrate. Cantități mari de fosfocreatină se găsesc în mușchi, energia pe care o înmagazinează aceste molecule fiind utilizată în timpul contracției musculare.

Acești compuși nu pot transfera direct gruparea de acid fosforic (și deci energia) altor compuși. Transferul de energie se face obligatoriu prin intermediul ATP, conform reacției :

$$\text{fosfocreatină} + \text{ADP} \rightleftharpoons \text{creatină} + \text{ATP}$$

Dealtfel nici compușii fosforilați din prima categorie nu pot transfera direct gruparea fosfat. De exemplu, în reacția :

$$\text{PEP} + \textit{D}\text{-glucoză} \rightleftharpoons \text{piruvat} + \textit{D}\text{-G-6-P}$$

sînt două etape distincte, catalizate, de două enzime :

$$\text{PFP} + \text{ADP} \xrightleftharpoons{\text{piruvatkinază}} \text{piruvat} + \text{ATP}$$

$$\text{ATP} + \textit{D}\text{-glucoză} \xrightarrow{\text{hexokinază}} \text{ADP} + \textit{D}\text{-G-6-P}$$

6.2.4. POZIȚIA CENTRALĂ A ATP ÎNTRE COMPUȘII MACROERGICI

ATP este compusul macroergic utilizat în cele mai variate activități care necesită consum de energie : majoritatea reacțiilor de biosinteză, transportul activ prin membrane, contracția musculară etc. ; pe de altă parte, ATP este singurul compus macroergic care se sintetizează pe seama energiei rezultate din catabolismul glucidelor, lipidelor și proteinelor, enzimele implicate în transferul grupării fosfat pe ADP fiind strict specifice. În al treilea rînd, fosfogenii, singurii dintre compușii macroergici care se acumulează în cantități mai mari decît necesitățile de moment, se formează prin intermediul ATP și își utilizează energia tot prin intermediul acestuia. De asemenea, UTP, CTP și GTP se formează pe seama energiei ATP. Pe baza acestor fapte se poate afirma că ATP ocupă o poziție centrală între compușii macroergici.

Este de menționat și faptul că într-o serie de reacții în care ATP transferă energie, legătura macroergică care se rupe este între grupările fosfat 1-2, formîndu-se AMP și PP_i. De exemplu, în cazul activării acizilor grași superiori în vederea degradării :

$$\text{R}-\text{COOH} + \text{ATP} + \text{CoASH} \rightleftharpoons \text{R}-\text{CO}\sim\text{SCoA} + \text{AMP} + PP_i$$

Scanned with OKEN Scanner

Pirofosfatul rezultat este hidrolizat rapid sub acțiunea pirofosfatazei :

$$PP_i + H_2O \rightarrow 2\,P_i$$

reacție în care se eliberează aproximativ aceeași energie ca la hidroliza ATP. Această energie suplimentează energia eliberată prin scindarea ATP în AMP și PP_i în vederea definitivării activării acizilor grași.

AMP nu poate reface ATP prin cuplarea cu PP_i. Această refacere implică mai întîi obținerea ADP, proces care are loc în prezența enzimei numită miokinază :

$$ATP + AMP \rightleftharpoons 2\,ADP$$

Aspecte mult mai variate ale transferului de energie în reacțiile biochimice se vor întîlni pe parcursul descrierii celor trei mari metabolisme: glucidic, lipidic și protidic.

Scanned with OKEN Scanner

7 METABOLISMUL GLUCIDIC

Metabolismul glucidic ocupă un loc central în procesele generatoare de energie din organism, indiferent de gradul lui de evoluţie. Aceasta datorită faptului că glucoza reprezintă în toate cazurile cel mai nobil carburant, deşi nu eliberează cea mai mare cantitate de energie, nu sintetizează, cu alte cuvinte, cea mai mare cantitate de ATP per mol. Dealtfel, în etapele de catabolizare a glucidelor, se interpun şi procesele de catabolizare ale lipidelor şi ale proteinelor.

Glucoza, reprezentantul principal al monozaharidelor, se formează în cea mai mare parte în plante prin procesul de fotosinteză, energia captată de la soare înmagazinîndu-se în legăturile sale carbon-carbon. În organismele heterotrofe glucoza trebuie introdusă în mod continuu, deoarece, s-a constatat că, pentru activităţile vitale ale organismului, pe zi se metabolizează circa 200 de grame de glucoză. O serie de ţesuturi şi organe, ca de exemplu creierul, hematiile sau celulele medulosuprarenale nu utilizează decît glucoza, fapt pentru care este necesară şi o sinteză endogenă a acesteia. Se apreciază că în ficat se pot sintetiza pînă la 12 grame de glucoză pe oră, sinteza avînd loc cu precădere noaptea.

Din punct de vedere medical, metabolismul glucidic reprezintă un proces de mare importanţă prin numeroasele tulburări care se manifestă în organism ca urmare a modificărilor ritmului acestui metabolism. Concentraţia glucozei sangvine — *glicemia* — reprezintă o constantă biochimică care reflectă un echilibru dinamic între procesele catabolice şi cele anabolice; ea este fin reglată de către numeroşi factori total diferiţi, şi anume: starea organismului — repaus, activitate, oboseală, acţiuni hormonale, vîrstă, sex şi, evident, numeroase tulburări de diverse naturi. Toate mecanismele de reglare sînt însă sensibile la variaţii mici ale concentraţiei glucozei sangvine.

Nu toate ţesuturile şi organele sintetizează cantităţi de glucoză suficiente pentru activitatea lor. Singura modalitate de aprovizionare cu glucoză a ţesuturilor şi organelor care o produc în cantităţi mici fiind calea sanguină, se înţelege de ce glicemia reprezintă un indice biochimic atît de important şi de ce orice variaţie sub sau peste valoarea normală de 80—120 mg% poate reprezenta o indicaţie deosebit de utilă clinicienilor.

Scanned with OKEN Scanner

Glucoza alimentară, rezultată în cea mai mare măsură prin hidroliza, la nivelul intestinului, a amidonului, lactozei şi zaharozei (şi care pentru un regim alimentar de 2 500 calorii este de 400 grame), este transportată prin vena portă la ficat unde poate fi : depozitată sub formă de glicogen hepatic, catabolizată pentru a se forma energia necesară proceselor vitale sau pentru formarea altor compuşi endogeni necesari sau redistribuită prin sînge spre celelalte organe şi ţesuturi.

Prin metabolism glucidic se va înţelege deci totalitatea reacţiilor implicate în cele trei procese la care se mai adaugă şi calea de sinteză *de novo* a glucozei, şi anume *gluconeogeneza*. Aceste procese fie că nu au loc în toate organele, fie că nu decurg cu aceleaşi viteze ; există specificităţi dependente de structura şi funcţia pentru care a fost creat fiecare organ.

Procesele care alcătuiesc metabolismul glucidic pot fi clasificate în procese anabolice şi catabolice, după cum urmează :

a) procese catabolice :

— *glicoliza*, proces care are loc pînă la transformarea glucozei în acizii piruvic şi lactic ;

— *glicogenoliza*, proces de oxidare a glucozei înmagazinată sub formă de glicogen ;

— *calea pentozofosfaţilor*, cale deviată, care ocoleşte şi scurtează o serie de etape din glicoliză ;

— *respiraţia celulară*, prin care se înţelege oxidarea acidului piruvic pînă la CO_2 şi H_2O, şi care, la rîndul ei, este rezultanta a trei procese distincte : ciclul K r e b s sau ciclul acizilor tricarboxilici ; lanţul transportorilor de electroni şi de hidrogen ; fosforilarea oxidativă ;

b) procese anabolice :

— *glicogenogeneza*, proces de sinteză a glicogenului din glucoză.

— *gluconeogeneza*, proces de sinteză a glucozei din diferite substanţe glucoformatoare cum ar fi unii aminoacizi, intermediari ai ciclului K r e b s sau acizii lactic şi piruvic ;

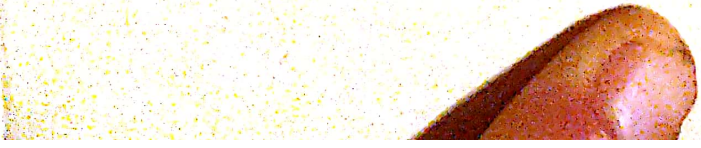
— *ciclul acizilor uronici*, proces de sinteză a acizilor glucuronic şi galacturonic ;

— *transformarea glucozo-6-fosfatului* hepatic şi renal în glucoză sanguină liberă.

Această clasificare include şi unele procese care depăşesc cadrul restrîns al metabolismului glucidic. De exemplu, ciclul K r e b s, proces catabolic conform acestei clasificări, reprezintă punctul de plecare a numeroase procese de sinteză, ca sinteza hemului de la succinil-coenzima A, sau a acizilor graşi liberi de la acidul citric ; de asemenea, prin fosforilarea oxidativă se sintetizează marea majoritate a ATP-ului necesar tot proceselor de sinteză din organism. Această clasificare are deci un rol didactic, uşurînd înţelegerea proceselor metabolice complexe care au loc în cadrul metabolismului glucidic şi al interrelaţiilor acestuia cu metabolismul lipidic şi proteic.

7.1. DIGESTIA ŞI ABSORBŢIA GLUCIDELOR

Glucoza este principala substanţă cu rol energetic a organismului animal şi, în consecinţă, toate celulele o utilizează în acest scop. Cantitatea totală a glucozei în organismul uman este de aproximativ 370 grame



Scanned with OKEN Scanner

(100 grame glicogen hepatic, 250 grame glicogen muscular și aproximativ 20 grame glucoză celulară sau sanguină), ceea ce corespunde la 1 600 calorii. Știind că pentru organismul uman în repaus sînt necesare în medie 2 500 de calorii/24 ore, rezultă că întreaga glucoză endogenă nu asigură necesarul energetic decît pe o durată de 15 ore. De aici necesitatea introducerii constante, prin alimente, a glucozei. Glucoza rezultă din hidroliza polizaharidelor — amidon sau glicogen — , dizaharidelor — zaharoză, lactoză — , sau a monozaharidelor libere. În tabelul 25 sînt redate sursele de glucoză, proveniența și procentul din aportul total de glucide alimentare.

TABELUL 25

Sursele de glucide și proporția din aportul alimentar total (%)

Glucidul	Proveniența	Monozaharidul care se formează prin digestie	%
A. *Polizaharide*			
a. *nehidrolizabile* :			
— celuloză			
— pectină	fructe, legume	glucoză	2
b. parțial hidrolizabile			
— inulină	fructe, legume	fructoză	
— manozani	,, ,,	manoză	2
— pentozani	,, ,,	pentoze	
c. hidrolizabile			
— amidon	cartofi, pîine, paste făinoase	glucoză	50
— glicogen	carne, ficat	glucoză	
B. *Dizaharide*			
— zaharoză	zahăr	glucoză + fructoză	25
— lactoză	lapte	glucoză + galactoză	10
— maltoză	malț	glucoză	1
C. *Monozaharide*			
— glucoză	fructe	glucoză	2
— fructoză	struguri, miere	fructoză	5

De remarcat procentul ridicat al amidonului, care reprezintă 50 % din totalul de glucide introduse alimentar și acela al zaharozei — zahărul comercial — 25 %.

Deoarece în sînge nu sînt identificate decît monozaharide, în cazuri speciale dizaharide, rezultă că polizaharidele și dizaharidele suferă un proces de hidroliză, de digestie care are loc sub acțiunea unor enzime specifice.

În cavitatea bucală polizaharidele, și mai ales amidonul, încep să fie scindate sub acțiunea α-amilo-1,4-α-glucozidazei (amilaza salivară sau ptialina) care desface legăturile 1-4 ale polizaharidelor, cu formare de dextrine și foarte mici cantități de maltoză. Dizaharidele și monozaharidele nu suferă nici un proces digestiv. Procesul de hidroliză catalizat de amilază continuă cîtva timp și în stomac, pînă la inactivarea enzimei datorită mediului puternic acid din stomac, unde nu au loc alte procese.

Scanned with OKEN Scanner

În duoden, sub acțiunea conjugată a α-amilo-1,4-glucozidazei (amilaza pancreatică) și α-amilo-1,6-glucozidazei, amidonul și glicogenul, precum și dextrinele, sînt desfăcute pînă la maltoză și mici cantități de glucoză.

Un caz aparte îl prezintă celuloza care, deși se găsește într-o mare cantitate în produsele alimentare de origine vegetală, nu reprezintă o sursă de glucoză, deoarece organismul uman nu posedă enzima capabilă să desfacă legăturile formate între resturile de β-glucoză. O anumită cantitate este însă desfăcută la nivelul intestinului gros, flora intestinală de aici conținînd în bagajul ei enzimatic și celulază. Glucoza formată este utilizată de microorganisme pentru necesitățile lor energetice. Celuloza contribuie însă la peristaltismul intestinal, la volumul și consistența bolului fecal.

Monozaharidele rămîn nemodificate și se absorb ca atare.

Absorbția monozaharidelor are loc practic în totalitate la nivelul intestinului subțire, dizaharidele și polizaharidele (mai ales) neputînd depăși bariera intestinală. Se consideră că sînt posibile *două procese de absorbție*, și anume : unul *pasiv*, de difuzie lentă prin peretele intestinal și care nu necesită consum de energie, așa cum este cazul absorbției pentozelor și manozei, și un *proces activ*, care se face cu un mare consum de ATP, și care este cel mai important din punct de vedere biologic. Acest proces, incomplet cunoscut, determină o viteză de absorbție prin peretele intestinal în funcție de concentrația glucozei, galactozei sau fructozei, existînd o serie de analogii cu viteza cu care o enzimă transformă un substrat în produs și care, de asemenea, este dependentă de concentrația substratului. Aceasta presupune că absorbția activă este fie consecința unor reacții enzimatice, fie că are loc datorită participării unui transportor, unui cărăuș de natură proteică. În primul caz, constatîndu-se că o serie de inhibitori ai hexokinazei (enzimă care fosforilează hexozele), ca florizina sau acidul monoiodacetic, frînează absorbția monozaharidelor, s-a considerat că pentru a putea depăși peretele intestinal este necesar ca în prealabil hexozele să fie fosforilate. De asemenea, pentru a ajunge în vena portă, este necesară prezența unei alte enzime, o fosfatază alcalină, care va defosforila hexozele. Deși acest proces enzimatic de fosforilare și defosforilare își are importanța lui bine stabilită în absorbția hexozelor, totuși cel de al doilea proces, care presupune existența unui cărăuș de natură proteică, specific fiecărui monozaharid, are mai multe argumente experimentale. Din faptul că pentru o bună absorbție este necesară prezența ionului de sodiu, precum și pe baza unor date de cinetică se presupune următorul mecanism de acțiune : proteina-cărăuș are două locusuri de legare specifică, unul pentru sodiu și altul pentru un monozaharid dat, acest ultim locus de legare fiind ușor modificat în funcție de prezența sau absența sodiului, ceea ce face ca monozaharidul să fie acceptat sau îndepărtat de pe proteină.

Aceste mecanisme explică de ce viteza de absorbție a monozaharidelor nu este identică, variind de la 100, cît este apreciată în mod arbitrar viteza de absorbție a glucozei, la 110 în cazul galactozei, la 45 pentru fructoză, 20 pentru manoză și 15 pentru riboză ; absorbția este dependentă atît de natura, cît și de concentrația monozaharidelor aflate simultan în intestin (galactoza inhibă de exemplu absorbția glucozei), de acțiuni hormonale, de integritatea structurală a intestinului și de o serie de factori de natură nervoasă

Scanned with OKEN Scanner

În peretele intestinal monozaharidele pot fi metabolizate într-o cantitate dependentă de nevoile energetice ale intestinului sau transformate, prin epimerizare, în glucoză (fig. 40) :

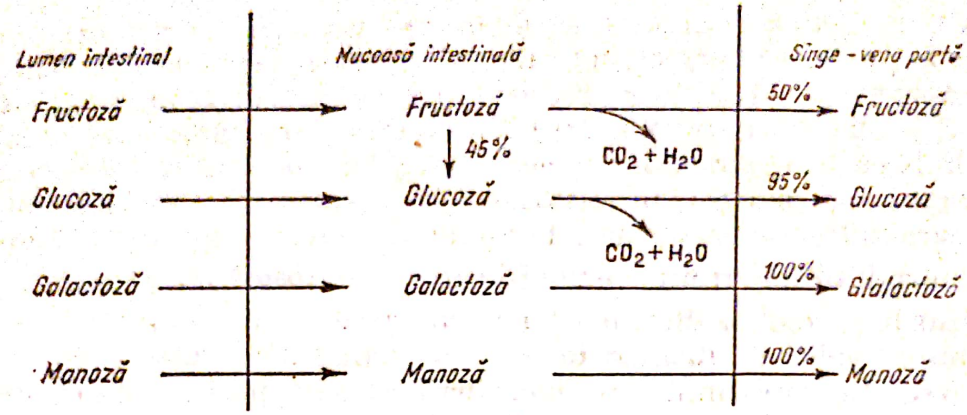


Fig. 40. Absorbția și metabolizarea monozaharidelor la nivelul intestinului subțire.

Monozaharidele care depășesc membrana intestinală sînt transportate prin vena portă la ficat, în primele două ore după-masă producîndu-se o ușoară hiperglicemie alimentară tranzitorie.

7.2. GLICOLIZA

Glicoliza este ansamblul de reacții prin care glucoza este oxidată pînă la doi acizi formați din trei atomi de carbon, și anume acizii piruvic și lactic. Acest proces se desfășoară în 11 etape, catalizate de tot atîtea enzime specifice și începe prin fosforilarea glucozei în interiorul celulei.

Glucoza este transportată de către sînge, de la intestin la ficat, în cazul glucozei exogene alimentare și de la ficat și rinichi spre toate celelalte organe și țesuturi în cazul glucozei endogene. Acest proces de transport prin sînge este deosebit de important, deoarece glicoliza are loc în absolut toate celulele, ceea ce necesită prin urmare un aport continuu de glucoză într-o concentrație dependentă de activitatea metabolică a celulei respective.

Toate cele 11 enzime glicolitice se găsesc în mod individual solubilizate în citoplasmă, sediul acestui proces metabolic.

Prima etapă a glicolizei constă în fosforilarea glucozei, și datorită necesității și generalității acestui proces metabolic, enzima care catalizează reacția — *hexokinaza* — este răspîndită în toate celulele. Această etapă, controlată de o serie de factori de naturi diferite, este o etapă de reglare, de control a întregului proces.

Hexokinaza este o enzimă nespecifică, putînd fosforila toate hexozele — glucoză, manoză, fructoză, galactoză — la hidroxilul alcoolic primar din poziția 6 cu formare de glucozo-6-fosfat, manozo-6-fosfat etc.

Scanned with OKEN Scanner

Ecuaţia generală a reacţiei catalizate de către hexokinază este următoarea :

$$R-OH+ATP \xrightarrow{Mg^{2+}} R-O-\textcircled{P}+ADP$$

Din reacţie reiese că pentru activitatea hexokinazei sînt necesari ionii de magneziu şi că donatorul de grupare fosfat şi, în acelaşi timp, al energiei necesare desfăşurării reacţiei este ATP.

Hexokinaza se găseşte sub forma a 3 izoenzime I, II şi III, a căror repartizare celulară este diferită. În ficat a mai fost pusă în evidenţă şi o altă enzimă, care catalizează specific numai fosforilarea glucozei, de unde denumirea de *glucokinază*, numită şi hexokinază tip IV.

Repartizarea celulară a celor 4 tipuri de hexokinaze este dată în tabelul 26 :

TABELUL 26

Repartizarea izoenzimelor hexokinazei în ţesuturile şi organele mamiferelor

ŢESUTURI		Hexokinază			Glucokinază	
		Izoenzime tip				
		I	II	III	IV	
Ţesuturi insulino-dependente	Muschi scheletici					
	Adipocit (tineri)					
	Inimă					
Ţesuturi insulino-independente	Creier					
	Eritrocit					
	Piele					
	Adipocit (bătrîni)					
	Rinichi					
	Ficat					
	Intestin					

Concentraţie: mare; medie; mică; absentă

Primele trei tipuri de hexokinaze se diferenţiază net de glucokinază prin afinitatea lor faţă de substrat, avînd un K_m mic, putînd fosforila rapid cantităţi mici de hexoze, în timp ce glucokinaza are un K_m mare, necesitînd concentraţii ridicate de glucoză, apropiate de valorile normale ale glicemiei. De asemenea, în timp ce activitatea hexokinazelor I, II şi III nu este influenţată semnificativ de cantitatea de glucide din hrană sau de activitatea hormonală, glucokinaza este o enzimă adaptativă, activitatea ei depinzînd într-o mare măsură de alimentele ingerate şi de concentraţia sangvină a insulinei. Glucokinaza, acţionînd numai la nivelul ficatului, permite depozitarea excesului de glucoză alimentară sub formă de glicogen hepatic.

Scanned with OKEN Scanner

Hexokinazele acţionează ca enzime cu structură alosterică, deci cu rol de reglare, şi în consecinţă vor fi inhibate de o serie de efectori, precum şi de diverşi metaboliţi şi intermediari metabolici. Astfel, concentraţia crescută de glucozo-6-fosfat determină frînarea activităţii hexokinazice pentru a se împiedica acumularea acestui ester fosforic peste posibilităţile de metabolizare ale organismului. Printre efectorii negativi notăm ADP şi acizii graşi liberi.

Hexokinazele nu pot cataliza decît reacţiile de fosforilare ale monozaharidelor, cu formarea esterilor fosforici corespunzători, luînd parte la una din cele patru etape ale glicolizei care nu este catalizată în ambele sensuri de aceeaşi enzimă. Energia liberă a acestei reacţii este de — 4 000 cal/mol, ceea ce face ca reacţia să fie ireversibilă.

Defosforilarea glucozei, proces care are loc numai în ficat şi rinichi, este catalizată de către glucozo-6-fosfatază tot printr-o reacţie ireversibilă ($\Delta G = -3\,300$). Prin această reacţie de defosforilare glucoza alimentară ajunsă la ficat prin vena portă este redistribuită celorlalte ţesuturi şi organe şi de asemenea repusă în circulaţie de rinichi, care, prin funcţia lor de filtrare, controlează şi concentraţia sangvină a glucozei.

Glucozo-6-fosfatul devine unul dintre punctele-cheie ale metabolismului glucidic prin diversele direcţii pe care le poate urma metabolizarea sa în sens anabolic sau catabolic (fig. 41) :

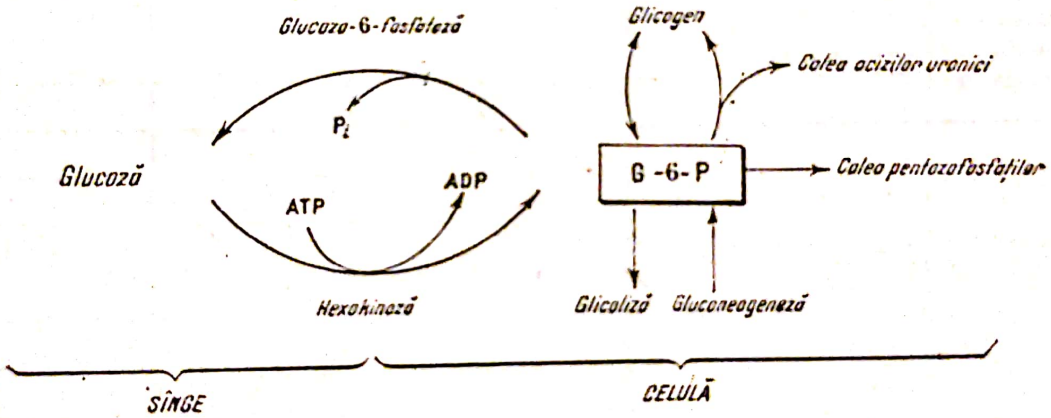
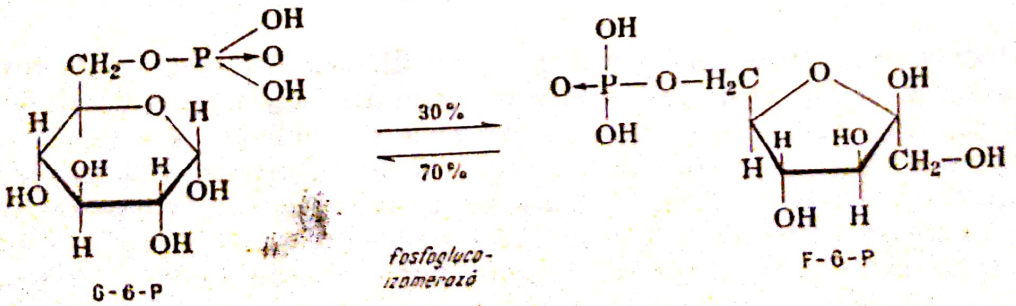


Fig. 41. Poziţia-cheie a G-6-P în metabolismul glucidic.

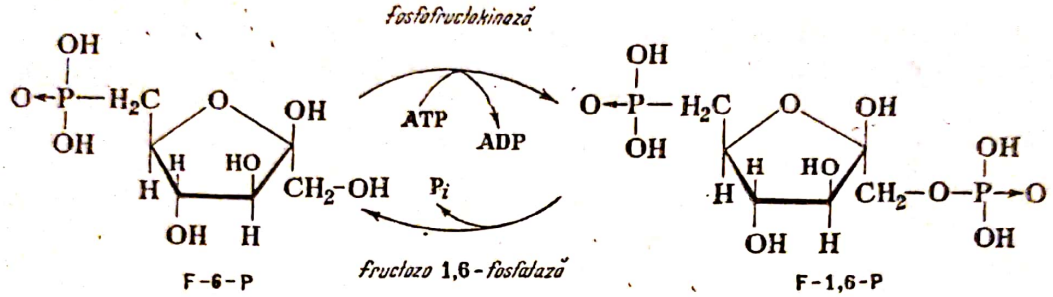
Etapa următoare — transformarea reversibilă ($\Delta G = +400$) a glucozo-6-fosfatului în fructozo-6-fosfat — este catalizată de *fosfoglucoizomerază* :



Enzima acţionează specific numai asupra esterilor fosforici ai glucozei şi fructozei şi necesită, pentru o activitate optimă, ioni de magneziu şi de mangan. Din ecuaţia prezentată se poate constata că echilibrul este îndrep-

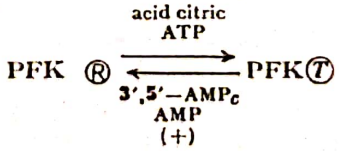
tat mai puțin în sensul formării fructozo-6-fosfatului, constituind prin urmare un sistem de frînare a vitezei de catabolizare a glucozo-6-fosfatului.

Urmează cea de a treia etapă a glicolizei, fosforilarea în prezența ATP a fructozo-6-fosfatului la fructozo-1,6-difosfat, etapă care este catalizată de către *fosfofructokinază*. Energia liberă a reacției este de 3 400 calorii, ceea ce arată că este o reacție ireversibilă. Aceasta este cea de a doua etapă din metabolismul anaerob al glucidelor în care reacțiile nu sînt catalizate în ambele sensuri — reversibil — de aceeași enzimă. Cea de a doua enzimă este fructozo-1,6-fosfataza.



Ca și în cazul primei etape, de fosforilare a glucozei, aceste două enzime au rol de reglare, de control, în cele două sensuri.

Fosfofructokinaza este o enzimă cu structură alosterică, formată prin unirea a patru protomeri, deci este un tetramer, fiecare din cele patru lanțuri polipeptidice ale protomerilor avînd centri activi capabili să lege labil substratul (fructozo-6-fosfatul), complexul Mg^{2+}-ATP și diverșii efectori pozitivi sau negativi. Se poate găsi în celulă sub două forme interconvertibile, o formă relaxată (*R*), care este activă, și o formă constrînsă (*T*), inactivă. Trecerea din forma *R* în forma *T* se realizează sub controlul acidului citric, un intermediar al metabolismului aerob al glucidelor (proces care se desfășoară în mitocondri) și al ATP ; în sens invers, echilibrul este deplasat sub acțiunea 3′,5′-AMP_c și AMP. Ultimii efectori sînt pozitivi, deci vor determina formarea enzimei active, iar primii sînt negativi :



De asemenea, un factor deosebit de eficient în aceste interconversiuni îl constituie *p*H-ul mediului, variații extrem de mici ale *p*H-ului putînd orienta echilibrul spre una din cele două forme, activă sau inactivă ; de exemplu, ușoare acidifieri ale mediului celular favorizează formarea enzimei inactive (*T*).

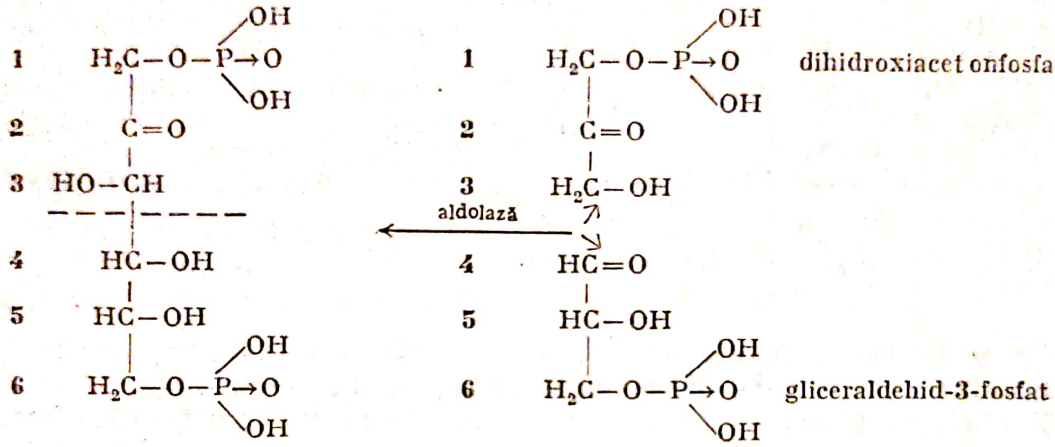
Fosfofructokinaza se găsește în organism sub forma a două tipuri de izoenzime, distincte atît în ceea ce privește structura, cît și caracteristicele lor cinetice, deși substratul este strict numai fructozo-6-fosfatul. Aceste două izoenzime sînt denumite tip *M* (mușchi), tip repartizat dominant în mușchi, inimă și creier și care determină o viteză mare a glicolizei

Scanned with OKEN Scanner

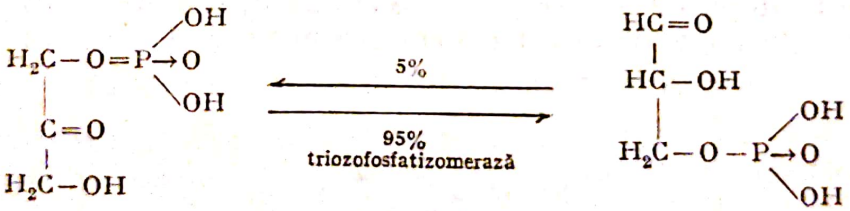
și tip *L* (*liver* = ficat), care se găsește mai ales în ficat (90—95%), rinichi (60%) și țesut adipos (60%) și determină o viteză mai mică a glicolizei. Datorită acestui fapt, viteza de degradare glicolitică în mușchi este de o sută de ori mai mare decît în ficat.

Reacția inversă este catalizată de fructozo-1,6-fosfatază care este, de asemenea, o enzimă cu rol de reglare, controlînd însă nu catabolismul glucozei, ci sinteza sa din diverse surse.

A patra etapă, care constă în scindarea moleculei de fructozo-1, 6-fosfat în doi triozofosfați, este catalizată reversibil ($\Delta G^\circ = +5\,700$ cal) de către *aldolază* :



Între cei doi triozofosfați care se formează, dihidroxiacetonfosfatul și gliceraldehid-3-fosfatul, se stabilește echilibru deplasat în sensul formării dihidroxiacetonfosfatului, și anume 95% față de 5%. Transformarea dihidroxiacetonfosfatului în gliceraldehid-3-fosfat are loc printr-o reacție catalizată de către o enzimă denumită *triozofosfatizomerază* și constituie a cincea etapă a glicolizei :



Echilibrul este rupt continuu prin transformarea constantă a gliceraldehid-3-fosfatului, trioza care se metabolizează, în acid 1, 3-difosfogliceric. Dihidroxiacetonfosfatul reprezintă, prin urmare, un fel de rezervor metabolic din care se va forma, cu încetul, gliceraldehid-3-fosfat, această etapă constituind deci un nou sistem de frînare a vitezei glicolizei.

Aldolaza este o enzimă -SH-dependentă, formată din patru subunități și se găsește sub forma mai multor izoenzime *A*, *B* și *C*. Izoenzima aldolază tip *A* se găsește în toate celulele, dar mai ales în mușchi ; tipul *B* de izoenzimă, care are posibilitatea de a cataliza și transformarea fructozo-1-fosfatului în dihidroxiacetonfosfat, se găsește repartizată mai ales în ficat și rinichi, organe unde are loc și glicogenogeneza, iar tipul *C* este

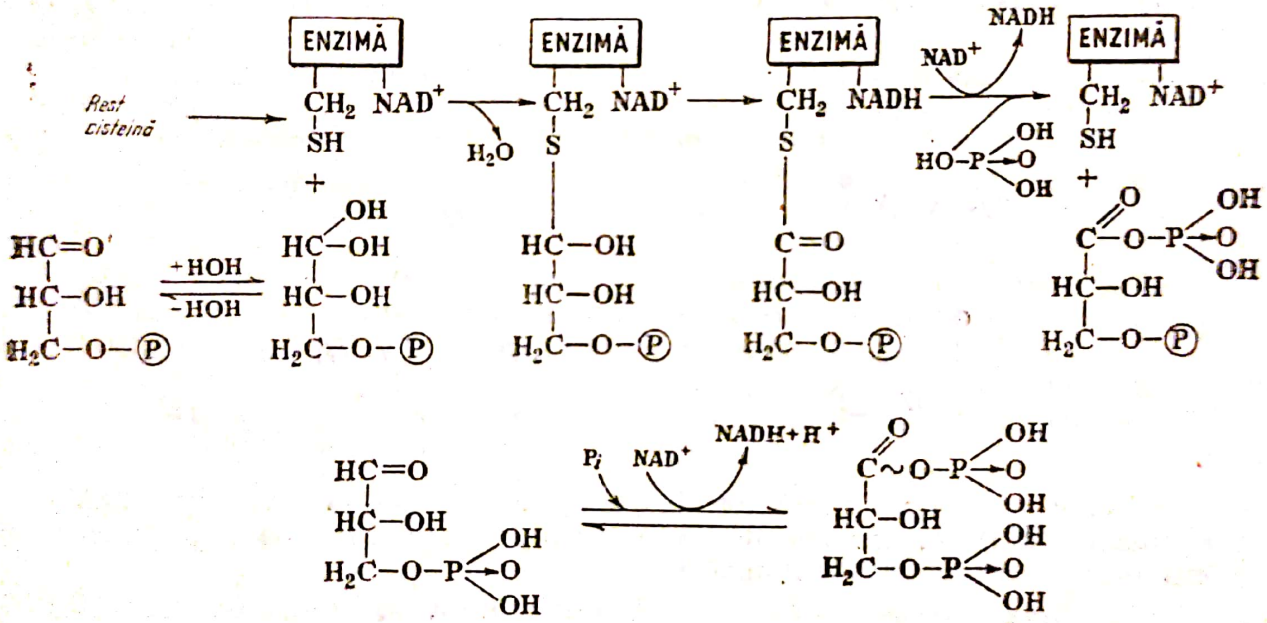
Scanned with OKEN Scanner

localizat mai cu seamă în creier și inimă. Cele 3 izoenzime au caracteristici cinetice diferite, reprezentînd factori de specificitate metabolică ale organelor în care se găsesc repartizate prioritar.

De la etapa de formare a triozofosfaților, ținînd seama de transformarea dihidroxiacetonfosfatului în gliceraldehid-3-fosfat, pentru fiecare moleculă de glucoză, se vor metaboliza în continuare două molecule de gliceraldehid-3-fosfat.

Dacă în etapele anterioare au avut loc două reacții endergonice, care au necesitat un aport de energie, deci consum de ATP (la nivelul hexokinazei și fosfofructokinazei), în continuare vor fi două etape exergonice, care vor elibera energie.

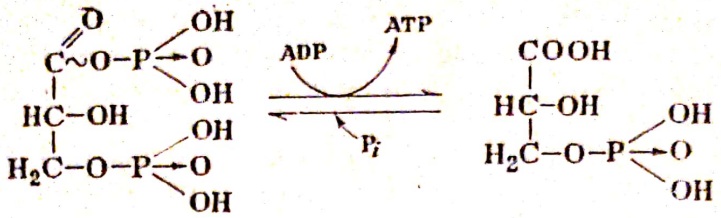
Sub acțiunea reversibilă ($\Delta G = +1\,500$ cal) a *gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenazei*, gliceraldehid-3-fosfatul se transformă, în cea de a șasea etapă a glicolizei, în acid 1, 3-difosfogliceric. Dehidrogenarea determinată de gliceraldehid-3-fosfat de hidrogenază necesită NAD^+, coenzimă capabilă să accepte hidrogen. Este o enzimă -SH- dependentă, un rest de cisteină participînd în mecanismul de reacție al enzimei :



Din reacția prezentată schematic mai sus rezultă că gliceraldehid-3-fosfatul se leagă inițial de gruparea tiolică a enzimei, luînd naștere un tioester. Asupra acestuia acționează enzima prin intermediul coenzimei NAD^+ ; în urma dehidrogenării se formează un complex acil-enzimă care acceptă o moleculă de acid *o*-fosforic din mediu, rezultînd acidul 1, 3-difosfogliceric, care se va desprinde de pe suprafața enzimei.

Produsul rezultat este un compus macroergic care, prin desfacerea hidrolitică a radicalului fosforil de la atomul de carbon 1, eliberează o energie liberă de — 11 800 calorii ; o parte din această energie este utilizată pentru formarea ATP din ADP. Acest transfer al grupării fosfat de la atomul de carbon 1 al acidului 1,3-fosfogliceric la ADP cu formare de ATP și

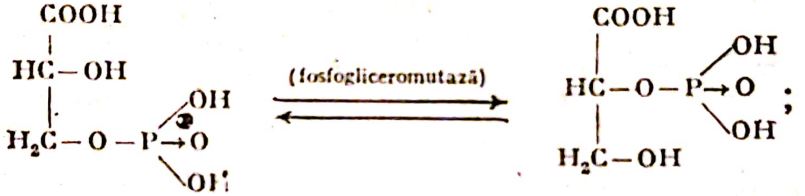
respectiv de acid 3-fosfogliceric este catalizat reversibil de *fosfogliceratkinază* și constituie a șaptea etapă a glicolizei :

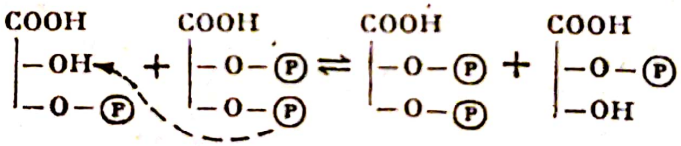


fosfogliceratkinază

Deci în această etapă se formează două molecule de ATP (reamintind că fructozo-1,6-fosfatul se desface în doi triozofosfați).

În etapa a opta, acidul 3-fosfogliceric se transformă în acid 2-fosfogliceric sub acțiunea unei *fosfogliceromutaze*. Reacția este activată de mici cantități de acid 2,3-difosfogliceric, schimbarea poziției grupării fosfat decurgînd ca în schema de mai jos ; mecanismul de reacție a fost precizat cu ajutorul izotopilor radioactivi :



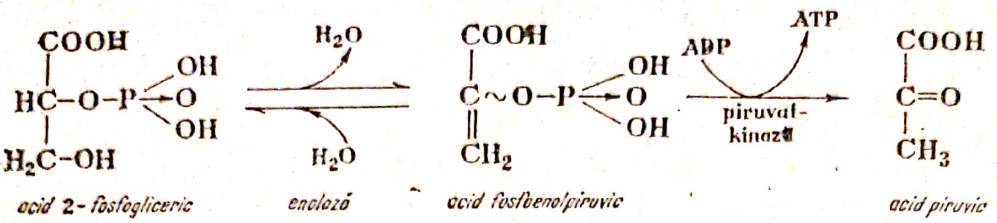


Avînd o energie liberă de + 1 000 calorii, reacția este reversibilă, echilibrul fiind, ca aproape în toate celelalte etape anterioare, îndreptat mai puțin în sensul catabolizării.

În etapa a noua se produce o deshidratare a acidului 2-fosfogliceric, reacția fiind catalizată de o *enolază*, care are nevoie în mod obligatoriu de ioni de magneziu pentru activitatea sa. Reacția poate fi privită și ca o oxidoreducere intramoleculară, atomul de carbon 2 devenind mai oxidat, iar atomul de carbon 3 mai redus. Intermediarul metabolic format, fosfoenolpiruvatul este una dintre cele mai energetice substanțe ale organismului, prin hidroliza radicalului fosforil de la atomul de carbon 2 eliberîndu-se așa cum s-a văzut la „Compuși macroergici", o energie de 14 800 cal/mol.

În etapa a zecea a glicolizei, PEP transferă ADP-ului, odată cu gruparea fosfat, și energia corespunzătoare legăturii macroergice, restul energiei fiind eliberat sub formă de căldură (7 500 calorii). Producîndu-se cu o asemenea eliberare de energie, reacția are loc practic într-un singur sens. Ea constituie cea de a doua reacție a glicolizei în care se formează ATP. Reacția inversă, care se produce în procesul de biosinteză a glucozei,

este catalizată de altă enzimă ; enzima care acţioncază în sensul catabolic se numeşte piruvatkinază, iar cealaltă fosfoenolpiruvatcarboxikinază :

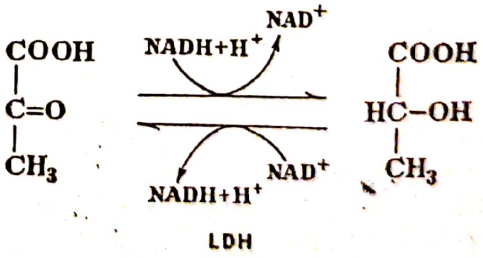


*acid 2-fosfoglicericenolază**acid fosfoenolpiruvic**acid piruvic*

Piruvatkinaza care catalizează reacţia ireversibilă de formare a acidului piruvic, simultan cu sinteza de ATP, se găseşte sub forma a două tipuri diferite, un tip *M* (muşchi) şi unul *L* (ficat), fiecare avînd cîte trei izoenzime. Dintre aceste două tipuri, tipul *L* are rol de reglare, fiind într-o strînsă dependenţă metabolică cu fosfoenolpiruvatcarboxikinaza, deoarece forma *L* se află repartizată numai în organele în care are loc reacţia inversă glicolizei (gluconeogeneza) şi anume în ficat, rinichi şi cortexul suprarenalei. În muşchi, inimă şi creier, neavînd loc acest proces anabolic, nu este cazul unei astfel de interrelaţii.

Piruvatkinaza tip *L* se comportă ca o enzimă alosterică, activitatea ei fiind influenţată de o serie de efectori pozitivi, şi anume de fructozo-1,6-difosfat, precum şi de efectori negativi ca ATP, acizi graşi liberi, NADPH sau alanină. Aceşti efectori determină transformări alosterice structurale reversibile, datorită formării unei structuri *R* activă sau a uneia *T* inactivă.

Acidul piruvic care se formează în această etapă este considerat termenul final al procesului glicolitic şi se găseşte în echilibru dinamic cu acidul lactic. Raportul dintre aceşti doi acizi este de obicei acid piruvic/acid lactic = 1/10 ; transformarea reversibilă a acestor doi acizi este catalizată de către LDH, avînd drept coenzimă NAD^+, şi constituie cea de a unsprezecea etapă a glicolizei :



Aşa cum s-a văzut în capitolul „Enzime", LDH se află sub forma a cinci izoenzime, toate derivînd de la tipurile parentale *H* şi *M* cu repartizare preferenţială în inimă pentru primul tip şi în muşchii scheletici şi ficat pentru al doilea tip. Cele două forme sînt regăsite în toate organele, dar procentajul este diferit. Au caracteristici cinetice distincte şi implicaţii metabolice remarcabile.

Raportul în care se găsesc cei doi acizi, acidul lactic şi acidul piruvic, depinde de gradul de oxigenare al ţesutului respectiv, acidul lactic formîndu-se într-o proporţie mai ridicată în condiţii anaerobe.

Sintetizînd, se poate considera că în glicoliză sînt două etape mari, fiecare din acestea constînd din mai multe reacţii. Reacţiile cuprinse în prima mare etapă sînt reacţii în care au loc procese de fosforilare a glucozei şi fructozei, ajungîndu-se la fructozo -1,6-fosfat ; ea poate fi numită

Scanned with OKEN Scanner

și *etapa esterilor hexozofosforici*. A doua mare etapă corespunde producerii de ATP pe seama defosforilării unor compuși cu trei atomi de carbon, primul dintre aceștia fiind gliceraldehid-3-fosfatul rezultat prin scindarea fuctozo-1,6-difosfatului, ca poartă corespunzător numele de *etapa esterilor triozofosforici*.

Din cele 11 reacții ale glicolizei, trei nu sînt reversibile, desfășurarea lor în sensul invers avînd loc sub influența unor enzime diferite de cele care asigură procesele catabolice.

Pentru a face un bilanț energetic al glicolizei se are în vedere faptul că un mol gram de glucoză (180 g) poate elibera prin ardere, în bomba calorimetrică, — 690 000 calorii; în aceleași condiții, acidul piruvic, termenul final al glicolizei, eliberează — 643 000 de calorii. Prin urmare în diversele etape ale glicolizei se eliberează — 47 000 de calorii. Știind că se formează patru moli de ATP și că energia liberă a reacției de hidroliză a acestuia este de — 7 300 de calorii, rezultă un total de — 29 200 calorii utilizate pentru sinteza ATP. Restul de — 17 800 calorii se pierde sub formă de căldură.

Deoarece din cei patru moli de ATP care se sintetizează trebuie să se scadă doi moli, care se consumă în reacțiile catalizate de hexokinază și fosfofructokinază, rezultă că bilanțul energetic net este de doi moli de ATP, deci de — 14 600 de calorii. Deși această energie este relativ mică, este deosebit de importantă, fiind energia de primă urgență, prima de care poate beneficia organismul pentru necesitățile sale. Ca o dovadă că lucrurile stau așa este faptul că o serie de celule își obțin energia necesară numai prin acest proces, eritrocitul fiind cel mai demonstrativ exemplu în acest sens.

Glicoliza are loc în absolut toate celulele organelor și țesuturilor, dar mai ales în mușchi, contracția musculară necesitînd un mare consum de energie, deci și un sistem eficient și extrem de rapid de refacere a ATP-ului consumat. Așa se explică de ce mușchiul conține cea mai mare cantitate de enzime glicolitice.

7.3. GLICOGENOLIZA

Necesitatea organismului viu de a dispune întotdeauna de o cantitate constantă de glucoză, care nu poate să scadă sub anumite valori, impune existența permanentă a unui depozit de glucoză. Acest depozit este *glicogenul*, un polimer format din α-glucoză și din care în intervalele dintre mese și în cazul unor eforturi fizice sau intelectuale intense se pot elibera rapid unități de glucoză. Concentrațiile cele mai ridicate în glicogen se găsesc la nivelul ficatului și mușchilor. Depozitarea în ficat se explică prin faptul că acesta este organul cu cele mai complete și complexe metabolisme, care deține în același timp poziția-cheie în calea principiilor alimentare absorbite din intestin; din ficat, glucoza liberă sau depozitată sub formă de glicogen poate fi redistribuită prin sînge tuturor celorlalte organe. Glicogenul sintetizat în mușchi este utilizat exclusiv pentru nevoile sale, contracția musculară fiind un proces care necesită un consum energetic

Scanned with OKEN Scanner

mare. Din aceste considerente, în timp ce concentrația glicogenului hepatic variază foarte mult în funcție de glucidele introduse prin alimente (între 0,1 și 10 g%), glicogenul muscular are valori mai constante (între 0,5 și 1,5 g%), scăderi evidente avînd loc numai după un efort fizic marcat.

Glicogenul, fiind un polimer format prin unirea unităților de glucoză legate 1,4- și 1,6-glicozidic, va fi scindat sub acțiunea conjugată a două sisteme enzimatice distincte. Acestea sînt în primul rînd *sistemul fosforilazic*, capabil să desfacă numai legăturile 1,4-glicozidice. și în al doilea rînd acela al așa-ziselor *enzime de deramificare* în cazul legăturilor 1,6-glicozidice.

Sistemul fosforilazic este constituit din mai multe enzime, și anume *fosforilaza b* (forma inactivă), *fosforilaza a* (forma activă) și alte două enzime capabile să transforme reversibil aceste două fosforilaze și anume : *fosforilaz-b-kinaza*, care transformă forma inactivă în formă activă, și *fosforilaz-b-fosfataza*, care catalizează reacția inversă. Acest sistem enzimatic complex presupune în mod evident un mecanism de reglare, fin coordonat de o serie de factori de natură diferită.

Sistemul fosforilazic prezintă o serie de particularități legate de specificitatea de organ a ficatului și mușchiului, cele două organe în care se găsește cu prioritate.

În cazul sistemului fosforilazic muscular, fosforilaza *b* este un dimer inactiv, care în mușchii în repaus se găsește într-o proporție de 85%. După primele fracțiuni de secundă de la începutul contracției musculare, acest raport se schimbă în favoarea fosforilazei *a*, care este un tetramer și care poate ajunge după 2—3 secunde la o proporție de 70%. Consecința evidentă este scindarea rapidă a glicogenului cu formare de glucoză care, prin metabolizare, va genera energie. Această transformare rapidă a fosforilazei *b* în fosforilază *a* are loc sub acțiunea fosforilaz-*b*-kinazei, enzimă care catalizează atît formarea tetramerului, cît și a celor patru legături esterice între grupările hidroxil ale serinei din fiecare protomer și acidul *o*-fosforic cedat de ATP (fig. 42); reacția necesită deci un apreciabil consum de energie.

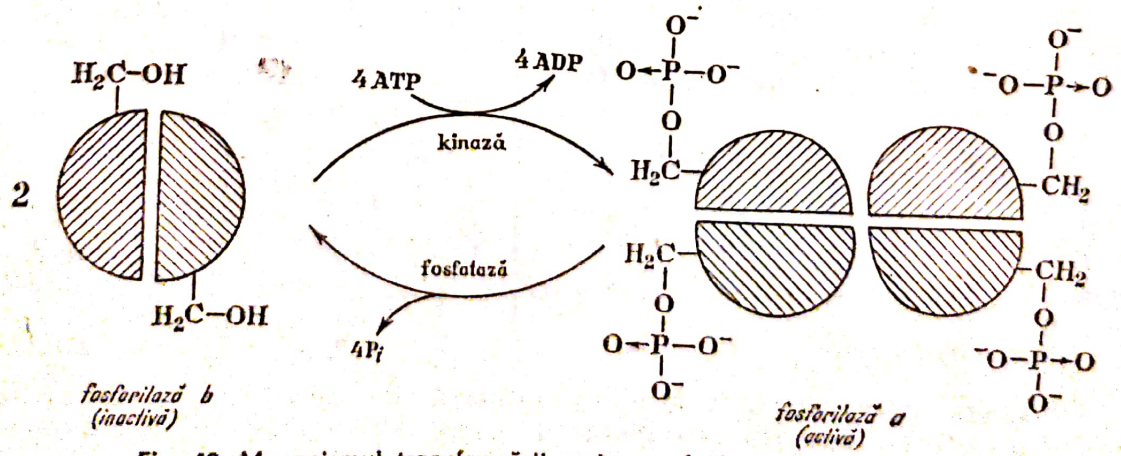


Fig. 42. Mecanismul transformării reciproce fosforilază *b* ⇌ fosforilază *a*.

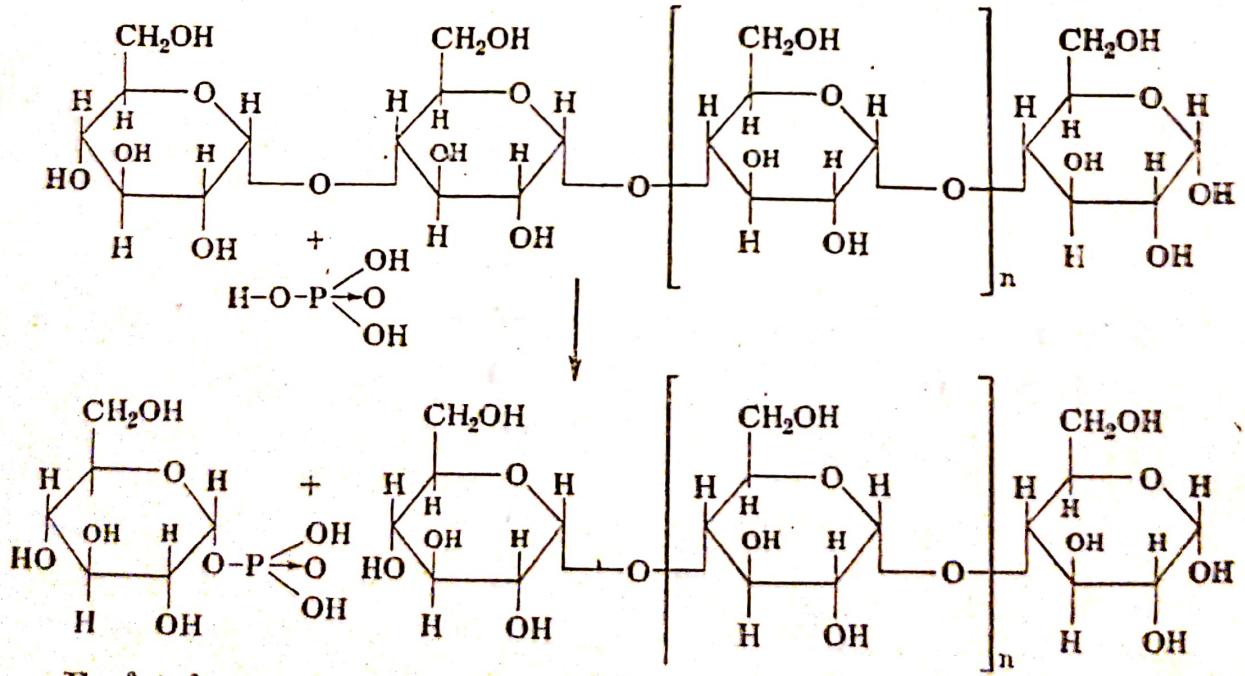
Fosforilaza *b* are caracteristici alosterice, fiecare din cei doi monomeri avînd locașuri specifice de legare pentru efectori, distincte de locul de legare

afectat formării tetramerului activ, fosforilaza *a*. Imediat după încetarea contracției musculare, sub acțiunea fosforilaz-*b*-fosfatazei, fosforilaza *a* se desface în două molecule de fosforilază *b*, revenindu-se imediat la echilibrul inițial de 85% fosforilază *b* și 15% fosforilază *a*.

Dintre efectorii alosterici care participă la interconversiunea celor două forme și la activitatea catalitică a celor patru enzime, se menționează AMP și 3′,5′-AMP$_c$. Asupra acestor interconversiuni acționează și adrenalina, un hormon hiperglicemiant (v. „Reglarea metabolismului glucidic").

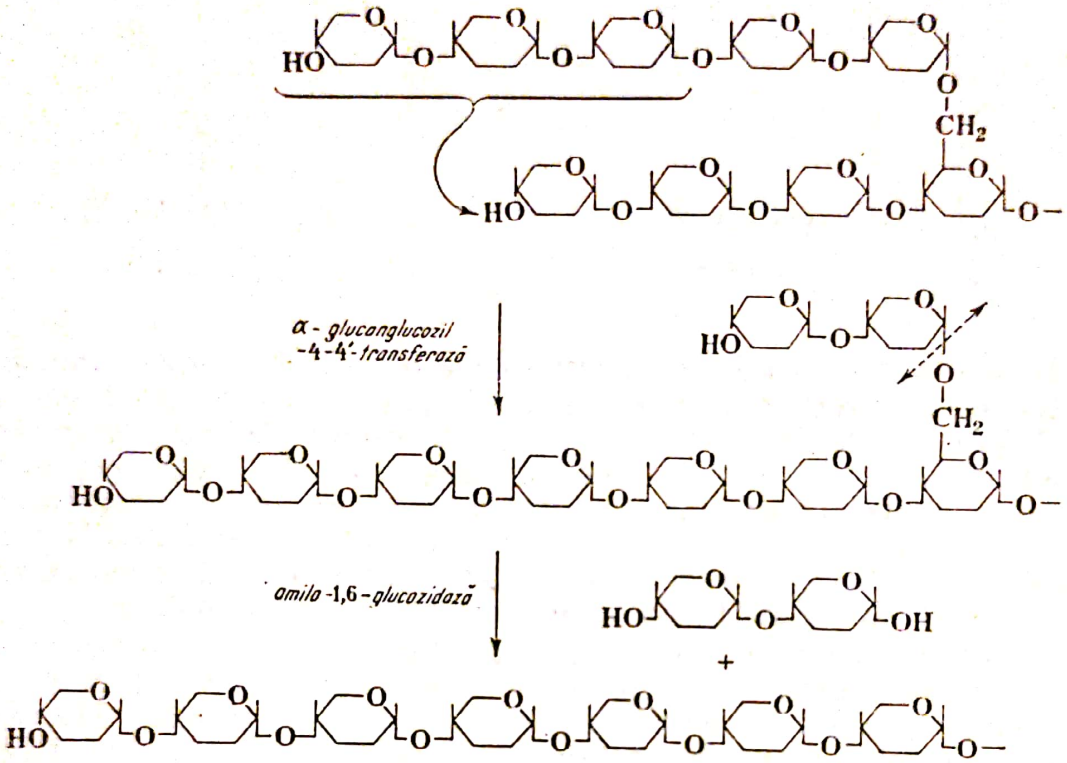
În ficat, organ de care depinde într-o bună măsură funcționarea în condiții optime a întregului organism, sistemele care reglează interconversiunea fosforilazelor sînt diferite din anumite puncte de vedere de cele care reglează interconversiunea fosforilazelor musculare. Diferențele constau atît în ceea ce privește factorii care acționează în sensul formării celor două tipuri de fosforilază, cît și în ceea ce privește structura enzimelor din sistemul fosforilazic. Unul dintre factorii de diferențiere îl constituie concentrația glucozei sanguine care, crescînd, poate frîna viteza reacțiilor de catabolizare a glicogenului hepatic, activînd în același timp sinteza acestuia. De asemenea, există diferențieri în acțiunea hormonilor ca, de exemplu, adrenalina care activează mult procesul de formare a fosforilazei *a* musculare, dar nu are decît un efect moderat în formarea celei hepatice, sau glucagonul, hormon care nu are efect decît asupra sistemului fosforilazic hepatic.

Fosforilaza musculară și cea hepatică acționează asupra capătului terminal al lanțului glicozidic, care are hidroxidul alcoolic din poziția 4 liber și desface legătura 1,4-glicozidică cu formare de glucozo-1-fosfat și glicogen cu un radical glicozidic mai puțin :



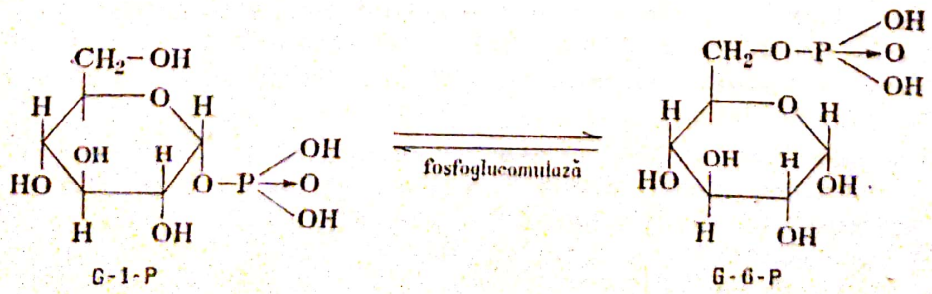
Fosfatul care esterifică glucoza scindată din glicogen provine de la acidul *o*-fosforic, deci nu este cedat de către ATP ; procesul se numește *fosforoliză* (adică desfacere cu ajutorul acidului fosforic). Fosforilaza *a* desface în continuare legăturile 1,4 pînă în momentul în care întîlnește o legătură 1,6 pe care nu mai este capabilă s-o scindeze. La acest nivel, în procesul de glicogenoliză acționează enzimele de deramificare. Una

este *α-glucanglicozil-4,4'-transferaza*, care este capabilă să lungească lanțul glicozidic format prin legături **1,4** prin mutarea unei porțiuni din zona ramificată a glicogenului, ușurînd acțiunea ulterioară a fosforilazei. Cealaltă enzimă este *amilo-1,6-glucozidaza* care, putînd desface legăturile **1,6**, permite acțiunea fosforilazei :



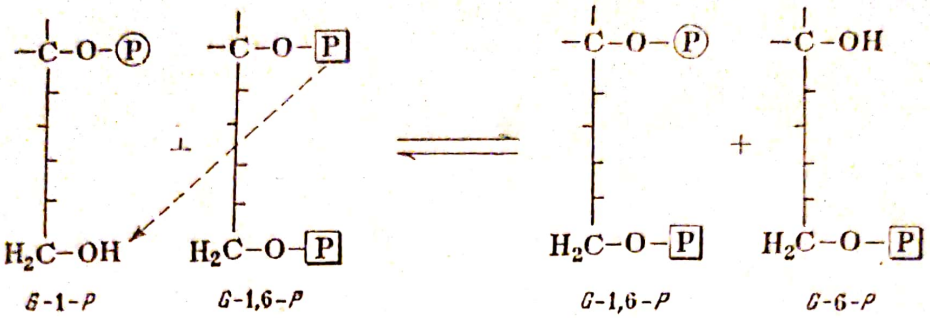
Toate enzimele amintite, care catalizează desfacerea unităților de glucoză din glicogen, au acțiuni coordonate și controlate în mod riguros, iar orice defecțiune dobîndită în cursul vieții sau de natură genetică (sinteza defectuoasă înnăscută a proteinei) va determina tulburări deosebit de grave, care se pot încadra în așa-zisele boli de tezaurizare, *glicogenoze*, constînd în îmbîcsirea celulei cu granule de glicogen, tulburîndu-i funcțiile. Se cunosc pînă în momentul de față șase tipuri diferite de glicogenoze, toate determinate de proasta activitate a enzimelor care catabolizează glicogenul.

Esterul 1-fosforic al glucozei, care se formează în cursul reacției catalizate de fosforilază, se găsește într-un riguros echilibru cu G-6-P, transformarea reciprocă a acestor doi esteri fiind catalizată de fosfoglucomutază printr-o reacție reversibilă :



G-1-P G-6-P

Mecanismul prin care se produce această transformare are același principiu ca și cel întîlnit în cazul formării acidului 2-fosfogliceric din acid 3-fosfogliceric, și anume în prezența esterului glucozo-1,6-difosforic ca activator :



În continuare, G-6-P poate urma două direcții distincte și anume să fie catabolizat prin glicoliză pe calea descrisă, în scopul obținerii de energie, sau defosforilat în ficat sub acțiunea glucozo-6-fosfatazei, iar glucoza liberă rezultată să fie vehiculată de către sînge spre alte organe și țesuturi. Trebuie subliniat faptul că glicogenoliza este un proces îndreptat net spre eliberarea rapidă a rezervelor de glucoză pentru a se putea face față unor eforturi fizice sau intelectuale, refacerea cantității de glicogen consumată efectuîndu-se de 10—100 de ori mai încet decît catabolizarea.

Glicogenoliza este un proces mai eficient din punct de vedere energetic decît glicoliza, bilanțul energetic net al glicogenolizei fiind de 3 moli ATP utilizabili, față de cei 2 moli utilizabili formați prin glicoliză. Diferența constă în faptul că nu se consumă decît un singur mol de ATP pentru fosforilarea glucozo-6-fosfatului la fructozo-1,6-fosfat, nemaifiind necesară fosforilarea glucozei sub acțiunea hexokinazei; deci 4 moli ATP—1 mol ATP = 3 moli ATP utilizabili.

În figura 43 se prezintă, schematizate, secvențele glicolizei și glicogenolizei (pag. 227).

7.4. CALEA PENTOZOFOSFAȚILOR

Un alt proces catabolic pe care-l pot suferi glucidele și care are loc tot în citoplasmă, este o cale scurtată, șuntată, ce ocolește o serie de etape glicolitice. Etapele acestei căi, numită *calea pentozofosfaților*, depind însă de glicoliză, începînd cu intermediarii (de exemplu G-6-P), iar în cursul reacțiilor se formează compuși care se vor metaboliza ulterior tot prin glicoliză.

Calea pentozofosfaților reprezintă o cale specială de metabolizare a glucozei, iar repartizarea celulară a enzimelor care catalizează reacțiile este dependentă de funcția organelor respective. Pentru a înțelege sensul priorității acestei căi metabolice în anumite organe, trebuie să i se evidențieze principalele rațiuni metabolice.

Scanned with OKEN Scanner

În primul rînd, calea pentozofosfaţilor reprezintă practic singura modalitate de sinteză endogenă a ribozei şi, evident, a dezoxiribozei, oze indispensabile structurilor ARN şi ADN, precum şi a tuturor nucleotidelor şi coenzimelor care au în structura lor aceste pentoze (ATP, GTP, NAD^+, coenzima A etc.).

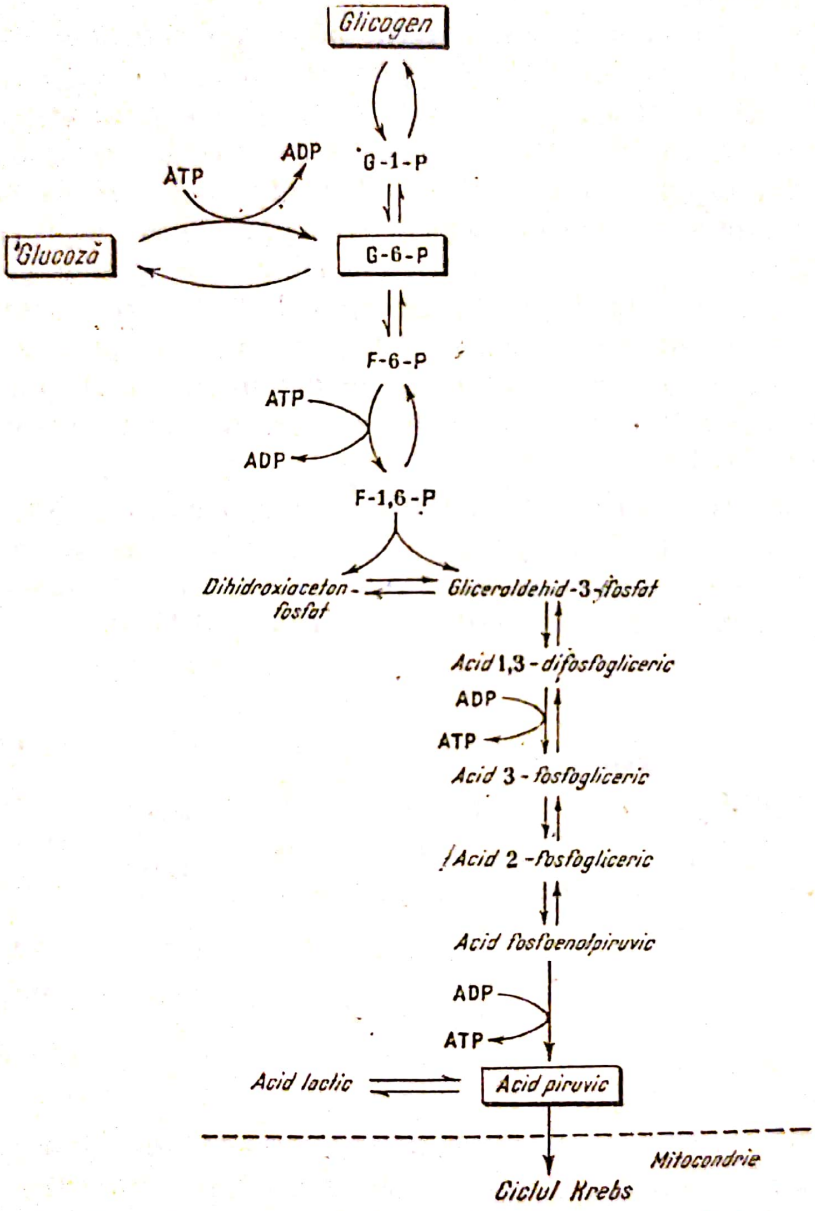


Fig. 43. Secvenţa reacţiilor glicolizei şi glicogenolizei.

În al doilea rînd, este calea principală de formare a NADPH, coenzimă care, spre deosebire de NADH, nu-şi cedează hidrogenul în procese catabolice, ci în procese anabolice, cum ar fi sinteza acizilor graşi şi sinteza derivaţilor cu structură sterolică.

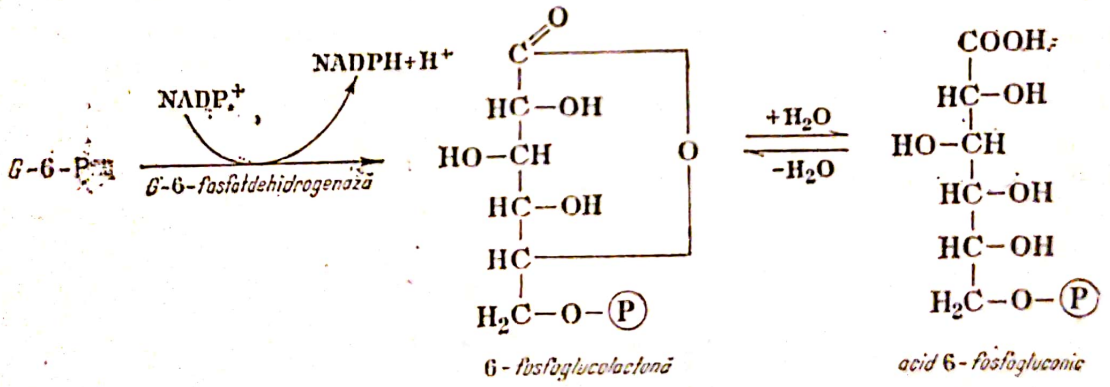
Al treilea rol important al acestei căi constă în faptul că permite ocolirea unor etape glicolitice care se desfăşoară cu consum de ATP, aşa

Scanned with OKEN Scanner

cum este etapa de transformare a F-6-P în F-1,6-P, catalizată de fosfofructokinază. În sfîrşit, pe această cale se formează triozofosfaţi cu multiple roluri metabolice. De exemplu, în acest proces se sintetizează gliceraldehid-3-fosfatul, care fie că este metabolizat pe calea glicolizei, fie că poate genera glicerol-3-fosfat, compus necesar sintezei de trigliceride sau de glicerofosfolipide.

Corelarea cu procesele menţionate oferă posibilitatea înţelegerii de ce calea pentozofosfaţilor decurge prioritar în unele organe ca glanda mamară în lactaţie, ficat, ţesutul epidimal adipos şi în eritrocit. Astfel, din cantitatea totală de glucoză care se catabolizează în glanda mamară în lactaţie cea degradată pe calea pentozofosfaţilor reprezintă pînă la 60% (pentru a se putea sintetiza în special lipidele din lapte); în ficat ea reprezintă 35% (mai ales pentru sinteza ribozei, a acizilor graşi liberi şi a fosfolipidelor), în ţesutul epidimal adipos 25% pentru sinteza trigliceridelor şi a acizilor graşi şi în sfîrşit 10% în eritrocit (pentru sinteza cu precădere a ribozei necesară structurii acizilor nucleici). Muşchii scheletici, inima, creierul şi rinichiul nu posedă decît în cantităţi reduse enzime ale căii pentozofosfaţilor.

Calea pentozofosfaţilor începe prin dehidrogenarea G-6-P sub acţiunea glucozo-6-fosfatdehidrogenazei, care are drept coenzimă $NADP^+$; se formează 6-fosfoglucolactona care, prin hidratare, se transformă în acid 6-fosfogluconic, în timp ce $NADP^+$ trece în NADPH:

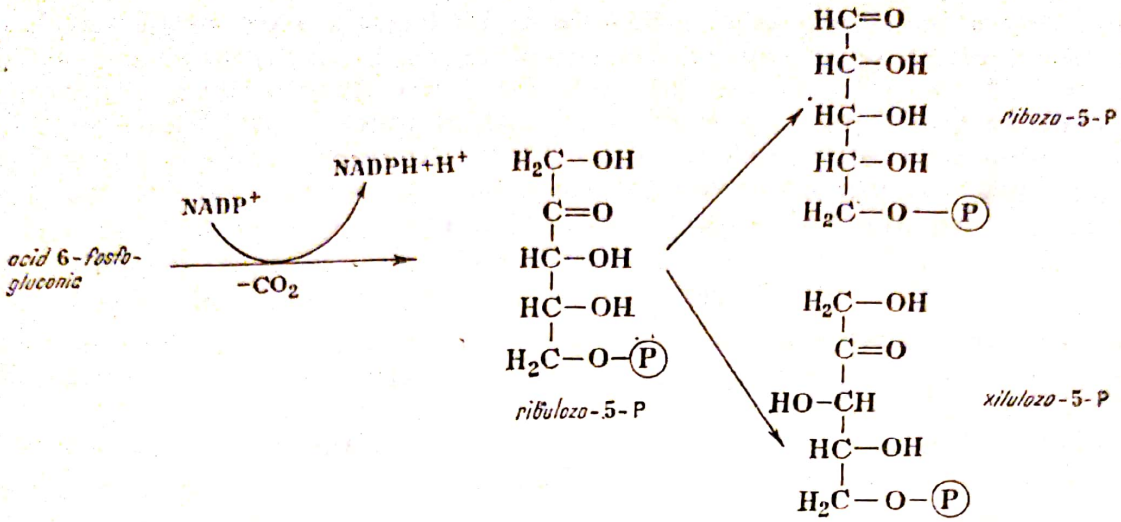


Lipsa din eritrocit a acestei enzime — datorită unui defect genetic — poate determina o gravă tulburare hematologică, o modificare a structurii eritrocitului, care are drept consecinţă o anemie severă. Ca orice enzimă care catalizează prima reacţie dintr-o cale metabolică, şi glucozo-6-fosfatdedrogenaza este o enzimă cu rol de reglare. Se găseşte în natură sub forma mai multor izoenzime, fiecare cu proprietăţi catalitice şi metabolice distincte.

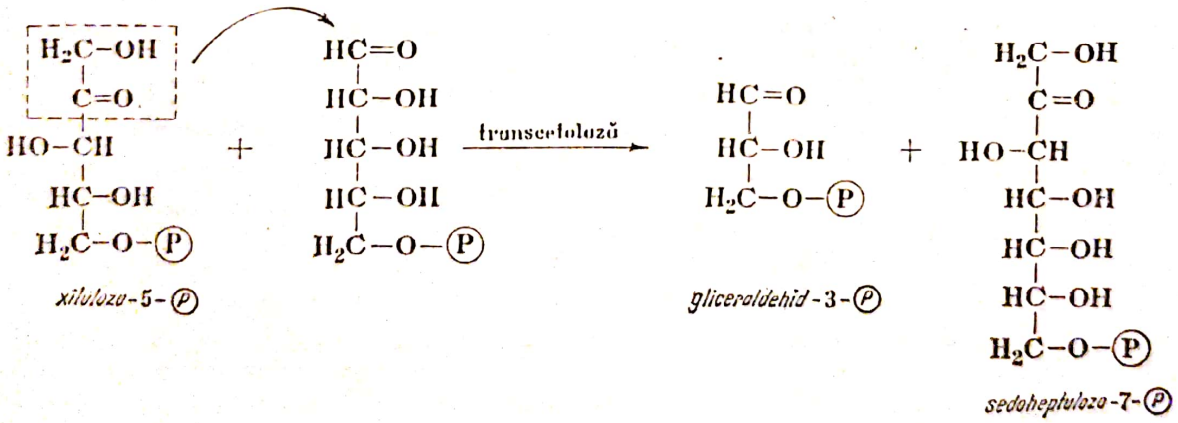
Acidul 6-fosfogluconic este simultan decarboxilat şi dehidrogenat, coenzima enzimei ce catalizează această reacţie fiind tot $NADP^+$, care trece în NADPH. Rezultă ribulozo-5-fosfat, o pentoză care se transformă

Scanned with OKEN Scanner

ulterior fie în xilulozo-5-fosfat (printr-o reacţie de epimerizare), fie în ribozo-5-fosfat, trecînd iniţial printr-o formă intermediară instabilă, enolică :



Ribozo-5-fosfatul este utilizat la sinteza ARN, ADN sau a altor compuşi sau este metabolizat în continuare pe calea pentozofosfaţilor. Această metabolizare implică acceptarea unei unităţi de doi atomi de carbon de la xilulozo-5-fosfat, cu formarea gliceraldehid-3-fosfatului (care se poate metaboliza prin glicoliză) şi a unui ester fosforic cu şapte atomi de carbon, denumit sedoheptulozo-7-fosfat ; reacţia este catalizată de o *transcetolază* care are drept coenzimă TPP :



Următoarea etapă, asemănătoare celei de mai sus, constă în mutarea fragmentului constituit din primii trei atomi de carbon de la sedoheptulozo-7-fosfat la gliceraldehid-3-fosfat, formîndu-se o oză cu patru atomi de carbon (eritrozo-4-fosfat) şi fructozo-6-fosfat, ultimul putîndu-se metaboliza prin glicoliză ; enzima care catalizează această reacţie este o *transaldolază* :

sedoheptulozo-7-fosfat + gliceraldehid-3-fosfat $\xrightarrow{\text{transaldolază}}$ eritozo-4-fosfat + fructozo-6-fosfat

În ultima etapă a acestui proces, prin condensarea eritrozo-4-fosfatului cu xilulozo-5-fosfatul iau naştere fructozo-6-fosfatul şi gliceraldehid-

-3-fosfatul, ambii compuși putîndu-se metaboliza pe calea glicolizei :

$$\text{eritrozo-4-fosfat} + \text{xilulozo-5-fosfat} \xrightarrow{\text{transaldolază}} \text{gliceraldehid-3-fosfat} + \text{fructozo-6-fosfat}$$

De subliniat faptul că gliceraldehid-3-fosfatul care se formează în diversele etape ale acestui proces metabolic, pe lîngă faptul că are posibilitatea să se metabolizeze prin glicoliză, mai poate genera, printr-un proces de hidrogenare, glicerol-3-fosfatul, o unitate structurală regăsită în compoziția trigliceridelor și a glicerofosfolipidelor. Această posibilitate reprezintă una din numeroasele interrelații metabolice care se stabilesc între glucide, lipide și heteroproteine (fig. 44).

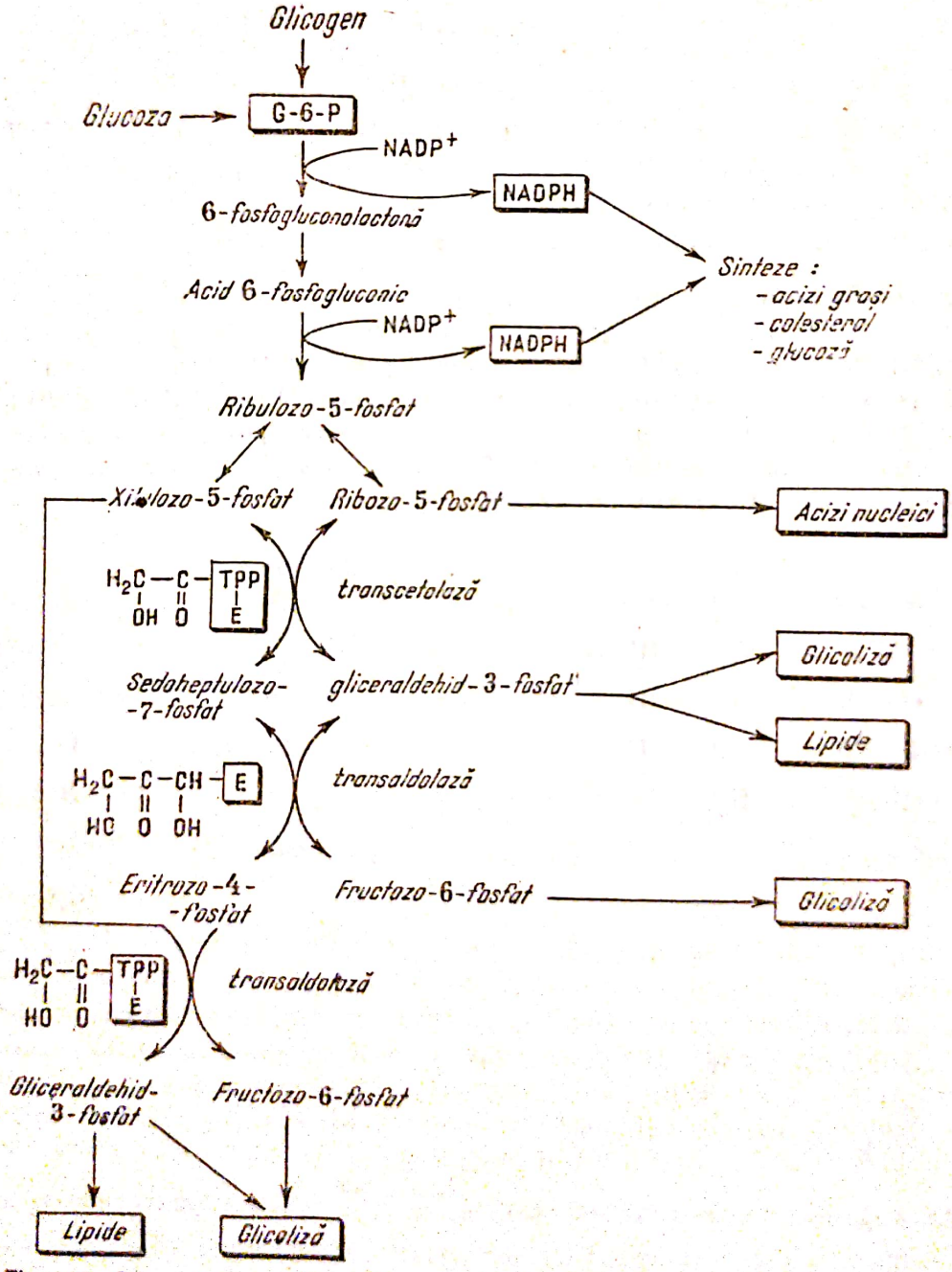


Fig. 44. Secvența reacțiilor căii pentozofostat și implicațiile ei metabolice.

Scanned with OKEN Scanner

7.5. OXIDAREA PIRUVATULUI

În condiţii aerobe, continuarea directă a glicolizei constă în catabolizarea acidului piruvic la nivelul mitocondriei, membrana mitocondrială fiind permeabilă pentru acest metabolit. În mitocondrie se desfăşoară respiraţia celulară, proces prin care acidul piruvic este degradat pînă la CO_2 şi H_2O, cu dezvoltarea unei mari cantităţi de energie; procesul este alcătuit din trei etape distincte, indisolubil legate între ele, şi anume:

— ciclul acizilor tricarboxilici sau ciclul K r e b s;
— lanţul transportorilor de hidrogen şi electroni;
— fosforilarea oxidativă.

Procesul respiraţiei celulare are deosebit de multe implicaţii metabolice, deoarece este calea majoră de obţinere a energiei necesare tuturor proceselor vitale ale organismului, iar intermediarii ciclului K r e b s asigură numeroase corelaţii între principalele metabolisme, respectiv glucidic, lipidic şi proteic.

Cele trei etape ale respiraţiei celulare nu pot avea loc decît în mitocondrie, formaţiune subcelulară cu o structură specializată în acest scop, şi care conţine în exclusivitate enzimele necesare desfăşurării acestui proces.

7.5.1. CICLUL ACIZILOR TRICARBOXILICI (CICLUL KREBS)

Ciclul K r e b s începe prin condensarea acidului oxalacetic cu acetilcoenzima A mitocondrială. O deosebită importanţă are selectivitatea extremă a membranei mitocondriale faţă de numeroasele substanţe celulare cu care vine în contact în mod continuu. Această selectivitate este atît de mare încît chiar substanţe cu masă moleculară mică, diverşii ioni ca cei de Na^+, K^+, Cl^-, nu pot intra sau ieşi din mitocondrie decît cu un mare consum de energie, printr-un proces de transport activ. Membrana mitocondrială este absolut impermeabilă pentru majoritatea intermediarilor prezenţi în celulă, împiedicînd intrarea sau ieşirea lor.

Dintre substanţele de mare interes metabolic care nu pot traversa în nici un sens membrana mitocondrială face parte şi acetil-CoA, care trebuie deci să se formeze în mitocondrie. Una dintre căile majore de sinteză a acetil-CoA mitocondriale constă în decarboxilarea oxidativă a acidului piruvic. Acidul piruvic, ca termen final al glicolizei, ia naştere în mod continuu în citoplasmă şi depăşind cu uşurinţă membrana mitocondrială, devine una din materiile prime de bază ale respiraţiei celulare.

Procesul de decarboxilare oxidativă a acidului piruvic este înfăptuit sub acţiunea unui complex enzimatic format din trei enzime diferite care constituie un ansamblu molecular indisolubil legat, extragerea uneia determinînd inactivarea întregului complex; în alcătuirea lui intră următoarele enzime: *piruvatdehidrogenaza*, care are drept coenzimă TPP, *lipoiltransacetilaza*, a cărei coenzimă este acidul lipoic şi *lipoildehidrogenaza*, care are drept coenzimă FAD.

Scanned with OKEN Scanner

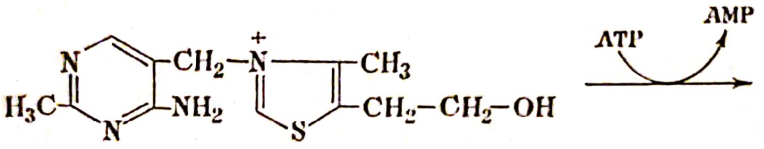
Raportul echimolecular în care se găsesc cele trei enzime și coenzimele corespunzătoare este următorul :

24 moli piruvatdehidrogenază + 24 moli TPP
1 mol lipoiltransacetilază + 24 moli acid lipoic
12 moli lipoildehidrogenază + 12 moli FAD.

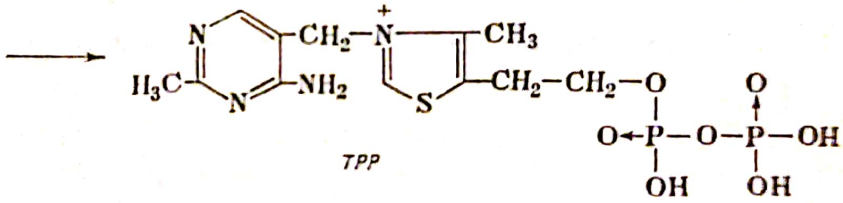
Complexul enzimatic, obținut în stare pură și cristalizat, acționează în mod ireversibil ($\Delta F = -8\,000$ cal), conform următoarei reacții generale :

$$\text{acid piruvic} + NAD^+ + CoA \rightarrow \text{acetil-CoA} + NADH + H^+ + CO_2$$

Procesul de decarboxilare și de dehidrogenare a acidului piruvic include mai multe reacții. În prima reacție, acidul piruvic se unește covalent cu ciclul tiazolic al vitaminei B_1 aflată sub forma sa activă de TPP, simultan având loc și decarboxilarea sa. TPP se obține din vitamina B_1 și ATP în modul următor :



Vitamina B_1



TPP

Gruparea hidroxietilică rezultată este dehidrogenată de către forma oxidată a acidului lipoic — coenzima lipoiltransacetilazei — care preia de altfel radicalul acetil format, prima enzimă reintrînd în reacție și decarboxilînd o altă moleculă de acid piruvic.

Gruparea acetil este desprinsă de pe molecula lipoiltransacetilazei și transferată coenzimei A, formîndu-se acetil-CoA și lipoiltransacetilază care conține acid lipoic redus. Acidul lipoic se va reoxida ulterior printr-o etapă care implică participarea celei de a treia enzime și anume lipoildehidrogenaza. $FADH_2$ format este reoxidat la rîndul său printr-o ultimă secvență al acestui proces de către NAD^+ care trece în NADH (vezi capitolul „Enzime" -Liaze).

Complexul enzimatic al piruvatdehidrogenazei se comportă ca o enzimă alosterică și reprezintă un factor de reglare, fiind deosebit de sensibil la variația concentrației unei serii de efectori cum ar fi ATP care, în concentrații crescute, inhibă activitatea enzimatică pentru a frîna formarea sa în continuare. Efectorii alosterici, pozitivi și negativi, acționează — ca și în cazul altor enzime cu rol de reglare — prin transformarea reversibilă a două forme : una activă și una inactivă.

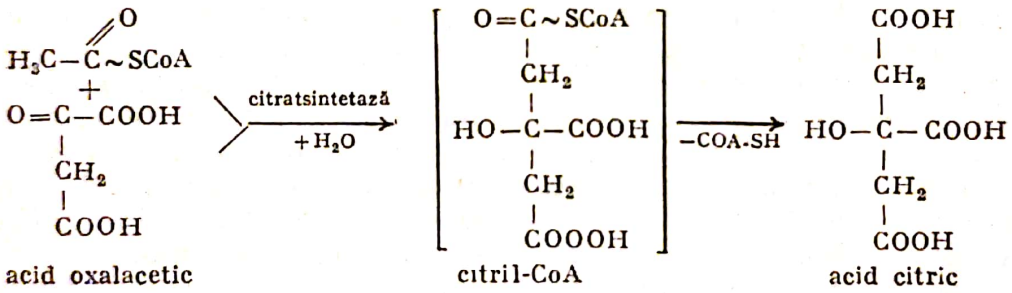
Referitor la această etapă trebuie amintit faptul că în cazul unei avitaminoze B_1 se produce o acumulare de acid piruvic cu consecințe grave

Scanned with OKEN Scanner

asupra metabolismului creierului, cel mai sensibil organ la orice tulburare a metabolismului glucozei, creierul făcînd parte, aşa cum s-a mai arătat, dintre organele care utilizează în exclusivitate glucoză pentru nevoile sale energetice.

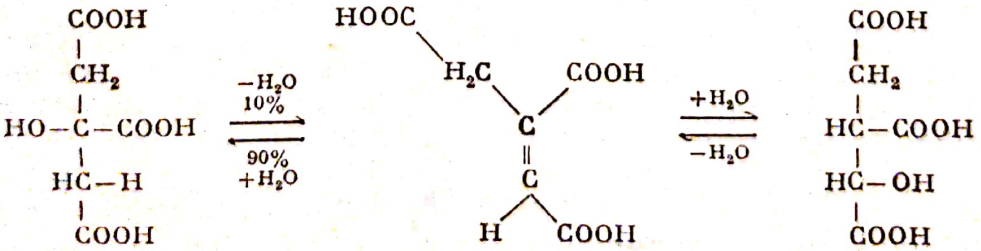
Deoarece aproximativ 2/3 din cantitatea de carbon care pătrunde în organism prin alimente este regăsit în acetil-CoA, rezultă că acest compus reprezintă un intermediar metabolic de o deosebită importanţă. Se poate afirma că *acetil-CoA reprezintă cea mai importantă răscruce metabolică*, deoarece prin metabolizarea sa pe calea ciclului K r e b s se produce energie; el se obţine prin degradarea nu numai a glucidelor ci şi a proteinelor şi lipidelor şi se transformă, în anabolism, în diverşi compuşi de natură glucidică, proteică şi mai ales lipidică (v. şi „Aciltransferazele" în capitolul „Enzime").

Ciclul acizilor tricarboxilici începe prin condensarea acidului oxalacetic cu acetil-CoA, formîndu-se acidul citric. Într-o fază iniţială, intermediară, ia naştere citril-CoA, care prin desprinderea CoA — ce-şi reia obligaţiile metabolice — eliberează acidul citric, acesta metabolizîndu-se în continuare. Reacţia, catalizată de *citratsintetază*, este practic ireversibilă ($\Delta F = -7\,700$ cal) şi, ca în cazul piruvatdehidrogenazei, este inhibată de concentraţii crescute de ATP, din aceleaşi raţiuni de menajare a rezervelor energetice:



acid oxalacetic — citril-CoA — acid citric

Transformarea ulterioară a acidului citric se petrece sub acţiunea catalitică a *aconitazei* care, prin intermediul apei — cu deshidratare şi hidratare succesive — va cataliza două reacţii, cu formare de acid *cis*-aconitic şi acid izocitric:



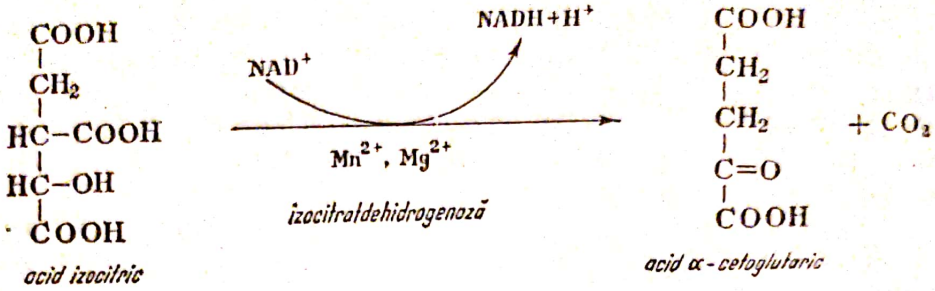
acid citric — acid *cis*-aconitic — acid izocitric

Echilibrul acestei reacţii reversibile este îndreptat spre formarea acidului citric, constituind un element de limitare a vitezei de metabolizare (asemănător acelora semnalate în cîteva rînduri la glicoliză), aconitaza rupînd însă echilibrul prin formarea continuă a acidului izocitric.

Scanned with OKEN Scanner

Studii efectuate cu izotopi radioactivi au arătat că acidul aconitic format este întotdeauna *cis*, izomerul *trans* neformîndu-se niciodată. Aconitaza este o enzimă care pentru activitatea şi stabilitatea sa necesită Fe^{2+}.

Acidul izocitric este simultan dehidrogenat şi decarboxilat de către *izocitratdehidrogenază*, care are drept coenzimă NAD^+, luînd naştere acidul α-cetoglutaric :

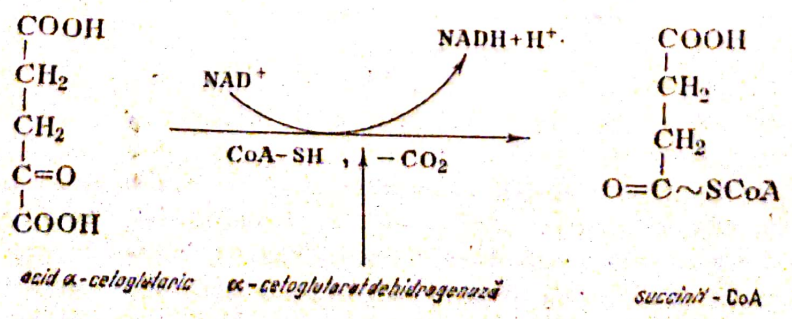


Izocitratdehidrogenaza, ca dealtfel şi diferite alte enzime ale ciclului K r e b s, a fost identificată şi în citoplasmă ; din acest motiv s-a crezut mai mult timp că unele etape ale ciclului K r e b s au loc şi în citoplasmă. În prezent se ştie precis că izocitratdehidrogenaza din citoplasmă catalizează anumite reacţii de biosinteză, auxiliare ciclului. Diferenţa între cele două enzime constă şi în aceea că cea citoplasmatică necesită drept coenzimă $NADP^+$ în loc de NAD^+, deşi ambele au nevoie pentru activitatea lor de prezenţa ionilor de mangan sau de magneziu.

Izocitratdehidrogenaza este şi ea o enzimă cu structură alosterică, a cărei activitate va fi modulată de o serie de efectori dintre care cei mai influenţi sînt ADP şi NAD^+, care activează enzima prin unirea a două molecule de dimer inactiv şi formarea unui tetramer activ. ATP şi NADH vor îndrepta echilibrul în sens invers, adică spre formarea tipului inactiv.

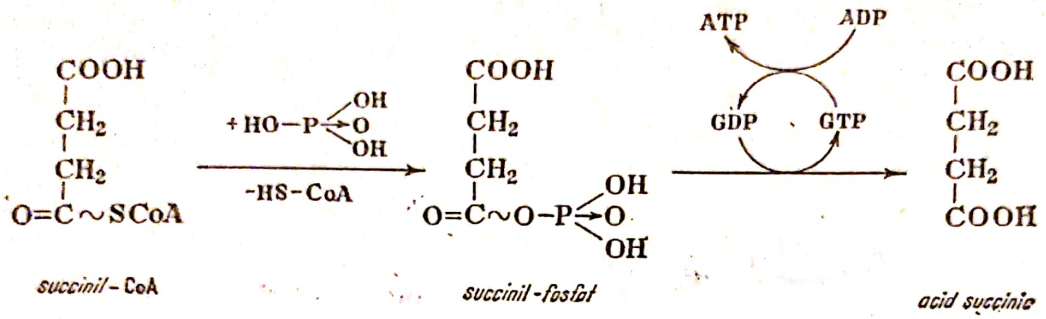
Acidul α-cetoglutaric, intermediar metabolic cu multe implicaţii în diferite alte procese (participă, de exemplu, în procesele de transaminare, cu formare de acid glutamic), este decarboxilat oxidativ de către *α-cetoglutaratdehidrogenază* printr-un proces asemănător celui de decarboxilare şi de dehidrogenare a acidului piruvic. Se va forma succinil-CoA.

Asemănarea cu piruvatdehidrogenaza indică faptul că enzima este formată de fapt din trei enzime distincte, care necesită drept coenzime, în ordine : TPP, acid lipoic şi FAD, ultima coenzimă fiind reoxidată ulterior de către NAD^+, iar NADH format va fi reoxidat de către lanţul transportorilor de hidrogen şi de electroni printr-o succesiune de reacţii care se va analiza ulterior. De subliniat că în acest proces se formează cea de a doua moleculă de CO_2 din ciclul K r e b s :



Succinil-CoA rezultată se transformă în acid succinic, iar desfacerea legăturii tioesterice macroergice va genera apariţia GTP, o substanţă macroergică, ce se va transforma ulterior în GDP prin cedarea către ADP a unui radical fosforil cu formare de ATP, compusul macroergic final.

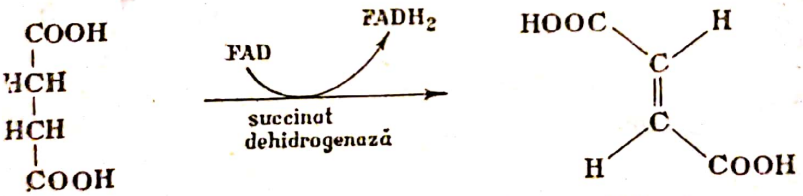
Această reacţie este unica etapă în care se sintetizează ATP în ciclul K r e b s. Enzima care catalizează reacţia se numeşte *succinil-CoA-sintetază*. Reacţia are loc în două etape, una dintre ele implicînd formarea succinilfosfatului :



succinil-CoA — *succinil-fosfat* — *acid succinic*

Succinil-CoA, în afară de rolul pe care-l joacă în angrenajul ciclului K r e b s şi în sinteza ATP, mai are multiple roluri metabolice, cel mai important dintre acestea fiind participarea sa împreună cu glicocolul, la sinteza precursorilor protoporfirinei IX, care, prin acceptarea Fe^{2+} se transformă în hem, gruparea prostetică a hemoglobinei.

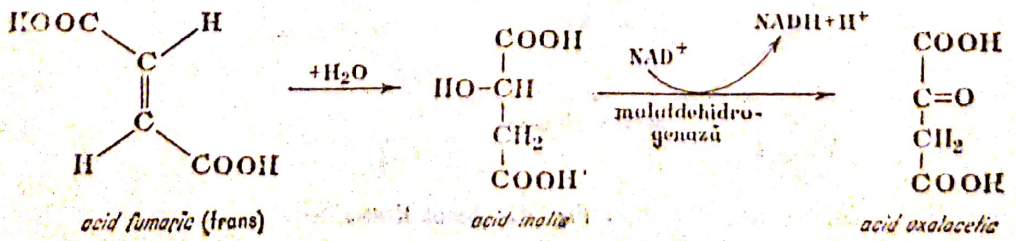
În continuare, acidul succinic este dehidrogenat sub acţiunea *succinat-dehidrogenazei*, singura enzimă care determină dehidrogenări în ciclul K r e b s şi a cărei coenzimă este FAD şi nu NAD^+. Enzima, legată strîns de membrana mitocondrială, conţine Fe^{2+}. $FADH_2$ rezultat va fi reoxidat în lanţul transportorilor de hidrogen de către coenzima *Q* :



acid succinic — *acid fumaric*

În urma acestei reacţii ireversibile ($\Delta G^\circ = -10\,000$ cal) ia naştere izomerul *trans* al acidului etilendicarboxilic, respectiv acidul fumaric.

În ultimele două reacţii ale ciclului K r e b s, acidul fumaric adiţionează apă sub acţiunea catalitică a *fumarazei*, formîndu-se stereoizomerul *L* al acidului malic, care în reacţia catalizată de *malatdehidrogenază* formează acidul oxalacetic. Se poate afirma că acidul oxalacetic, care se reface în final, are rolul de cărăuş al acetil-CoA :



acid fumaric (trans) — *acid malic* — *acid oxalacetic*

Scanned with OKEN Scanner

Malatdehidrogenaza are drept coenzimă NAD^+ a cărei reoxidare va avea loc la nivelul lanţului de transportori de hidrogen şi de electroni, ca şi în cazul celorlalţi acceptori de hidrogen din ciclul K r e b s. Şi această enzimă a fost semnalată extramitocondrial, avînd o importantă funcţie metabolică în procesul de gluconeogeneză, sinteza *de novo* a glucozei, dar avînd în acest caz drept coenzimă $NADP^+$ în loc de NAD^+.

Pentru a scoate mai pregnant în evidenţă principalele funcţii metabolice ale ciclului K r e b s, etapele sale sînt grupate în figura 45. Figura semnalează şi o altă cale, care poate avea loc numai în ficatul mamiferelor; este vorba de posibilitatea suplimentării acidului oxalacetic prin

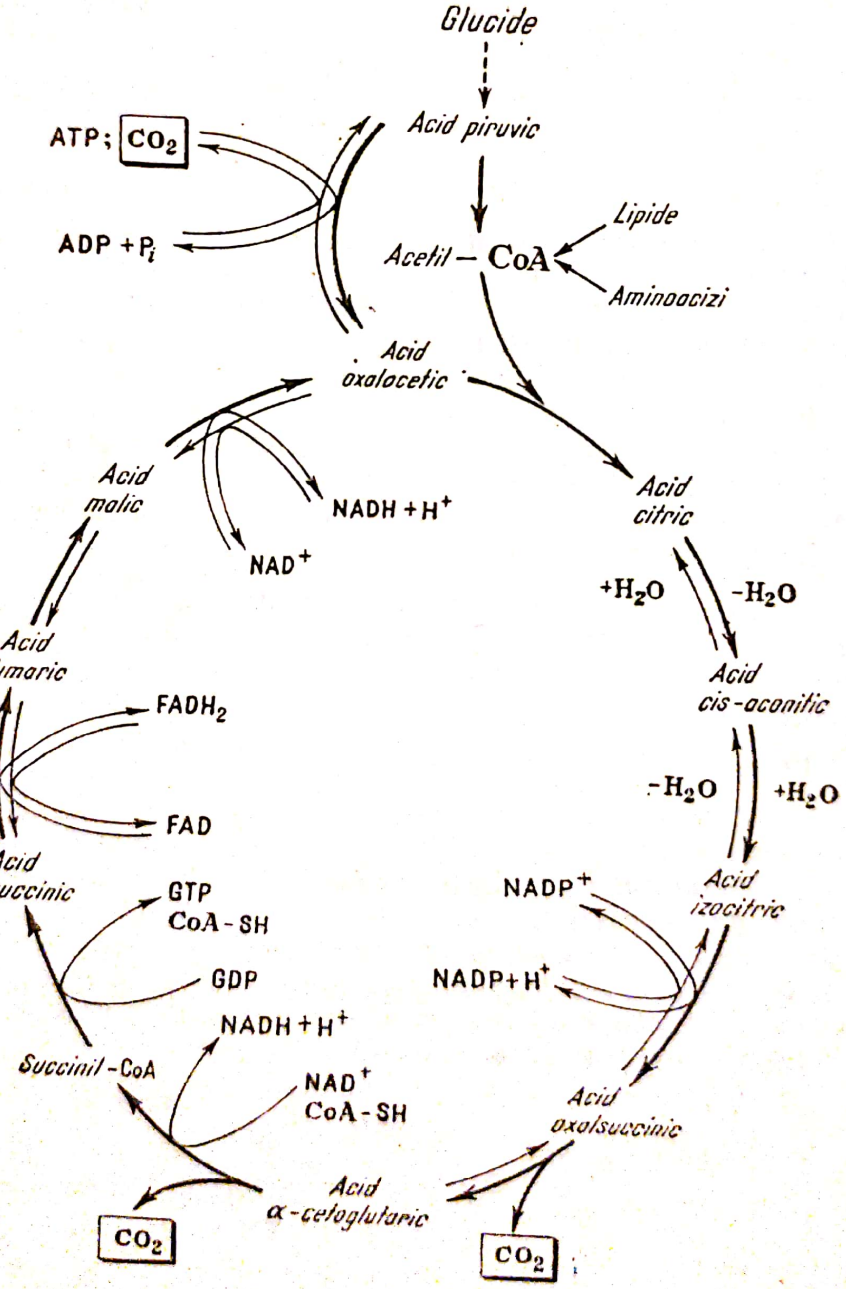


Fig. 45. Ciclul Krebs.

Scanned with OKEN Scanner

carboxilarea acidului piruvic. Enzima care catalizează acest proces — *piruvatcarboxilaza* — este sub un strict control metabolic, acționînd prompt la scăderea concentrației de acid oxalacetic.

Din figura prezentată reiese că în ciclul K r e b s se produc două molecule de CO_2, în etapele de decarboxilare ale acidului izocitric și α-cetoglutaric. Dacă se adaugă și molecula de CO_2 eliberată la decarboxilarea acidului piruvic, se obține un total de trei molecule de CO_2, care reprezintă de fapt cei trei atomi de carbon ai acidului piruvic metabolizat.

Pe parcursul ciclului se eliberează patru perechi de atomi de hidrogen, în etapele de dehidrogenare ale acizilor izocitric, α-cetoglutaric, succinic și malic. Dacă se adaugă și în acest caz perechea de atomi de hidrogen eliberați la trecerea acidului piruvic în acetil-CoA, se obține un total de cinci perechi de hidrogen. Aceste perechi de hidrogen sînt cedate lanțului de transportori de hidrogen și electroni cu formare — prin procesul de fosforilare oxidativă — de ATP, de energie.

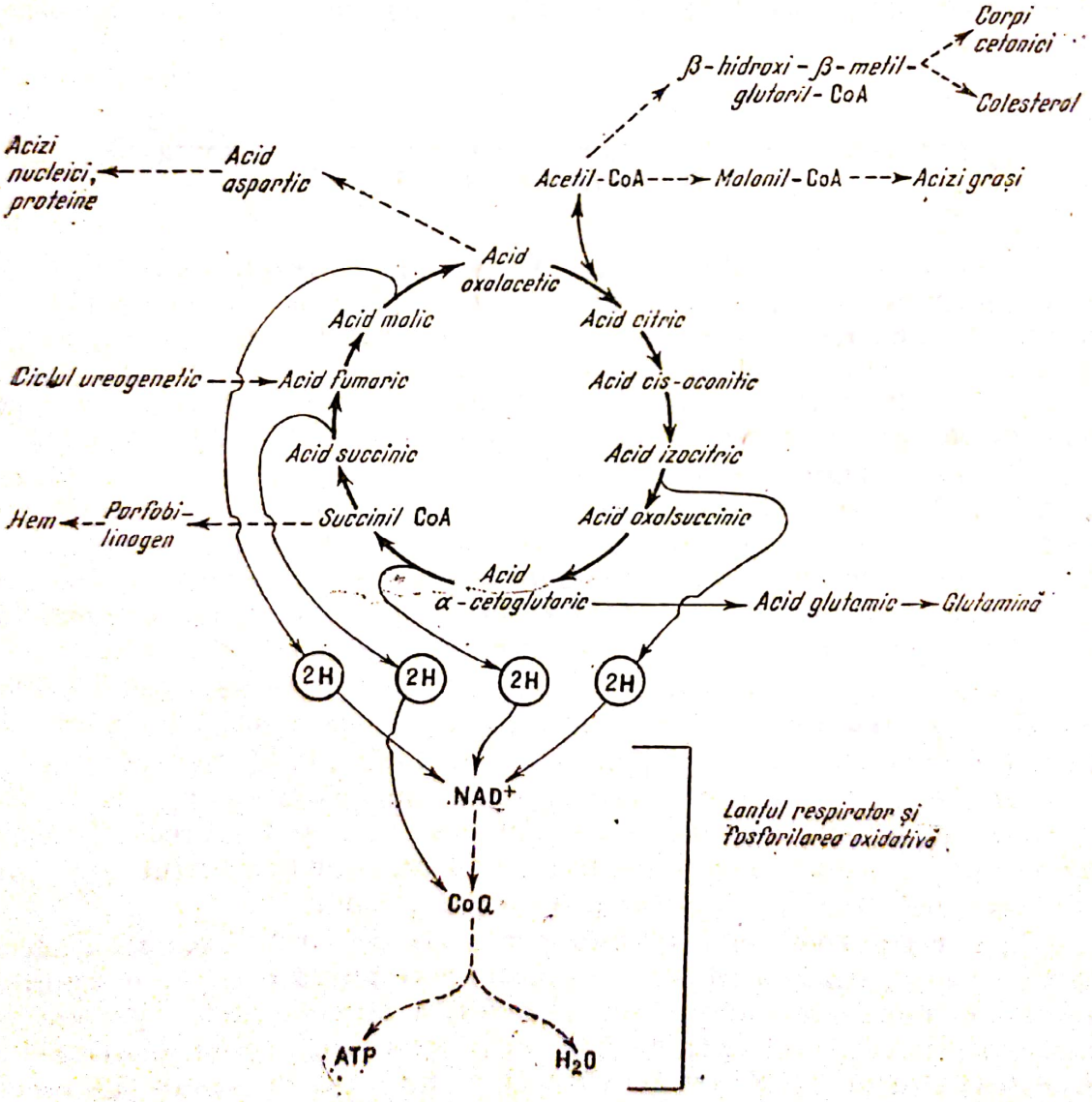


Fig. 46. Corelațiile ciclului Krebs cu alte căi metabolice.

Scanned with OKEN Scanner

Ciclul K r e b s nu reprezintă deci un proces energetic, deoarece nu se formează decît un singur mol de ATP dintr-un mol de acid piruvic : acest proces este însă un generator continuu de NADH şi $FADH_2$ care se reoxidează, cu producere de energie, în lanţul transportorilor de hidrogen şi electroni.

Se menţionează din nou că ciclul K r e b s reprezintă calea finală prin care se oxidează atît aminoacizii, cît şi acizii graşi liberi ; ca şi în cazul glucidelor, scopul oxidării acestora este obţinerea de energie.

Un alt rol, de asemenea deosebit de important, al ciclului K r e b s, îl constituie contribuţia sa la sinteza unor compuşi de o maximă însemnătate. Astfel, din acetil-CoA, sintetizată în exces, se pot forma corpi cetonici şi colesterol, din acidul citric — acizi graşi liberi, din acidul α-cetoglutaric — acid glutamic şi ulterior glutamină, din succinil-CoA — hem, din acidul malic şi oxalacetic — glucoză, din acidul oxalacetic — acid aspartic.

O parte din aceste relaţii anabolice ale ciclului Krebs sînt redate în figura 46 ; figura scoate în evidenţă şi intermediarii de la care începe sinteza ATP.

7.5.2. LANŢUL TRANSPORTORILOR DE HIDROGEN ŞI DE ELECTRONI. FOSFORILAREA OXIDATIVĂ

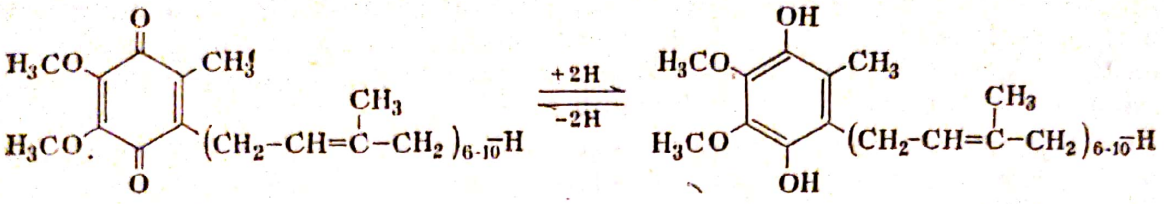
În condiţii aerobe degradarea glucozei are ca rezultat final formarea moleculelor de CO_2 (pe seama atomilor de carbon) şi a celor de H_2O (pe seama atomilor de hidrogen). După cum s-a arătat anterior, CO_2 se formează pe parcursul ciclului K r e b s ; totodată, pe parcursul acestui ciclu, sînt eliberaţi opt atomi de hidrogen. Atomii de hidrogen sînt preluaţi de către enzime specifice, a căror coenzime sînt NAD^+ şi FAD.

Problema care se pune în continuare este aceea a modului în care atomii de hidrogen fixaţi de aceste enzime ajung în final să se combine cu oxigenul pentru a forma molecule de apă. Totalitatea reacţiilor de oxidoreducere care alcătuiesc acest proces, implicînd evident enzimele corespunzătoare, constituie ceea ce obişnuit se denumeşte *lanţul transportorilor de hidrogen şi de electroni* sau prescurtat *lanţul respirator*.

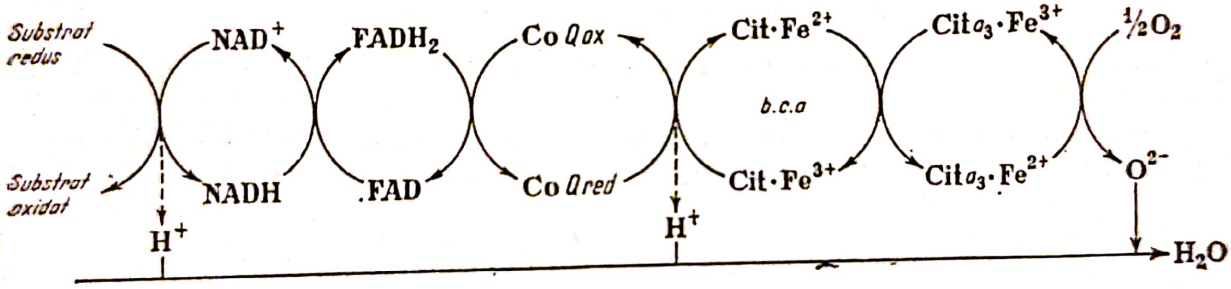
Pe de altă parte, aşa cum s-a arătat la descrierea oxidoreductazelor, reacţiile de oxidoreducere sînt însoţite de variaţii ale energiei libere. În toate reacţiile lanţului respirator variaţia energiei libere este negativă, deci aceste reacţii sînt exergonice. Pe seama unei părţi din energia liberă se sintetizează constant molecule de ATP din ADP şi P_i. Procesul poartă numele de *fosforilare oxidativă* el fiind, evident, cuplat cu lanţul respirator. De aceea, cele două procese vor fi tratate împreună.

Lanţul transportorilor de hidrogen şi electroni este localizat exclusiv în mitocondri, enzimele de oxidoreducere corespunzătoare fiind aranjate spaţial în membrana internă lipoproteică, a mitocondriei. Aşa cum s-a mai arătat în capitolul „Enzime", oxidoreductazele care asigură procesul de transport sînt de tip NAD^+ (sau $NADP^+$), FAD sau citocromi. La proces participă şi o enzimă a cărei coenzimă, denumită ubichinonă sau coenzimă *Q*

(Co*Q*), are o structură chinonică în starea oxidată şi o structură fenolică în starea redusă :

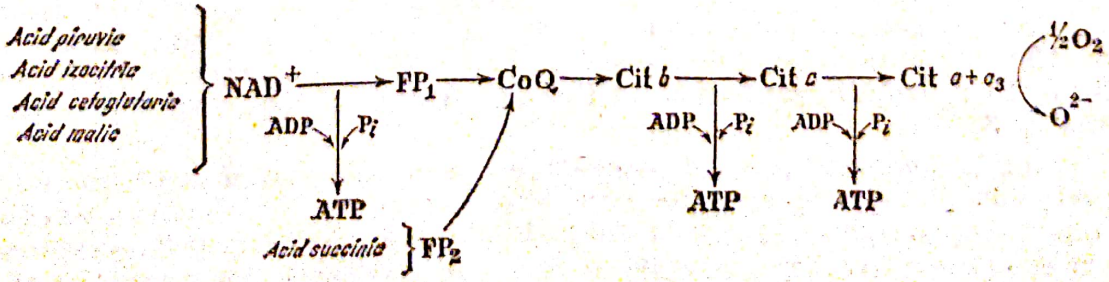


Potenţialul redox al Co*Q* fiind slab electronegativ (—10 V) o situează după NAD+ şi FAD, cu potenţiale electronegative mai mari, dar înaintea citocromilor a căror potenţiale sînt electropozitive (v. „Oxidoreductazele" şi fig. 30). Ţinînd seama de aceste potenţiale, procesele de oxidoreducere ale lanţului transportorilor de hidrogen şi electroni au următoarea secvenţă :



Urmărind această secvenţă de reacţii se deduce uşor faptul că pînă la Co*Q* oxidoreducerile au loc prin pierdere, respectiv cîştig de hidrogen, de la acest nivel făcîndu-se prin pierdere sau cîştig de electroni. Ultimul citocrom din secvenţă, citocromul a_3 sau citocromoxidaza, este singurul capabil să reducă oxigenul ; anionul O^{2-} astfel format se va combina cu cei doi protoni, dintre care unul se eliberează în cursul oxidării substratului de către NAD+, iar cel de al doilea la nivelul Co*Q*.

Pentru a urmări procesul de fosforilare oxidativă, cuplat cu lanţul respirator, secvenţa reacţiilor de oxidoreducere se redă într-o formă simplificată, specificîndu-se în plus faptul că în timp ce acizii piruvic, izocitric, α-cetoglutaric şi malic sînt oxidaţi de NAD+, acidul succinic este oxidat de FAD (notat aici cu FP_2 pentru a distinge această oxidoreductază de cea care oxidează NADH, notată prin FP_1) :



Pentru formarea unui mol de ATP din ADP și P_i este necesară o energie de cel puțin 7,3 kcal (v. „Compuși macroergici"). Deși toate reacțiile de oxidoreducere din lanțul respirator au ΔG negativ, numai trei dintre acestea îndeplinesc condiția de mai sus ($\Delta G \geqslant -7{,}3$ kcal), astfel că numai pe seama energiei libere a acestor reacții se sintetizează ATP. Reiese că pe seama oxidării cîte unui mol din acizii piruvic, izocitric, α-cetoglutaric și malic se formează cîte trei moli ATP, în timp ce pe seama oxidării acidului succinic se formează doar doi moli de ATP.

Raportul dintre P_i necesar sintezei de ATP și oxigenul necesar reoxidării transportorilor de hidrogen și electroni poartă numele de *cît de fosforilare* (P/O), el fiind bine precizat astăzi pentru numeroase substraturi.

Datele prezentate sînt utile în stabilirea bilanțurilor energetice. Astfel, oxidarea unui mol de acid piruvic din cei doi care rezultă prin oxidarea glucozei, va determina sinteza a 15 moli de ATP, sumă care rezultă din următoarele etape:

$$\text{acid piruvic} \rightarrow \text{acetil-CoA} \xrightarrow{\text{NADH}} 3 \text{ moli ATP}$$

$$\text{acid izocitric} \rightarrow \text{acid } \alpha\text{-cetoglutaric} \xrightarrow{\text{NADH}} 3 \text{ moli ATP}$$

$$\text{acid } \alpha\text{-cetoglutaric} \rightarrow \text{acid succinic} \xrightarrow{\text{NADH}} 4 \text{ moli ATP}$$

(la această reacție se mai formează un mol de ATP din GTP, care rezultă prin eliberarea legăturii macroergice, tioesterice, a succinil-CoA)

$$\text{acid succinic} \rightarrow \text{acid fumaric} \xrightarrow{FADH_2} 2 \text{ moli ATP}$$

$$\text{acid malic} \rightarrow \text{acid oxalacetic} \xrightarrow{\text{NADH}} 3 \text{ moli ATP}$$

$$\text{Total } 15 \text{ moli ATP}$$

Din doi moli de acid piruvic se formează 30 moli ATP.

Pentru a obține bilanțul energetic al degradării aerobe a glucozei, la cei 30 moli de ATP trebuie să se adauge încă patru moli care se formează pe seama reacției de oxidare a aldehidei **3**-fosfoglicerice (mecanismul intim al producerii acestuia nefiind prezentat aici) și alți patru moli de ATP care se formează în glicoliză. Rezultă un *total de 38 moli ATP*, care constituie bilanțul net al sintezei de ATP, rezultat din oxidarea totală a glucozei pînă la CO_2 și H_2O. Scăzînd doi moli de ATP consumați în reacțiile de fosforilare a glucozei, de către hexokinază, și a fructozo-**6**-fosfatului, de către fosfofructokinază, rezultă că bilanțul final al oxidării glucozei este de 36 moli ATP.

Deci, un mol de glucoză (180 g glucoză), care are o energie liberă de −680 000 cal., va genera 36 moli de ATP utilizabili. Știind că hidroliza ATP va elibera −73 000 calorii, atunci $36 \times -73\,000 = -263\,000$ calorii. Prin urmare, randamentul final al oxidării glucozei va fi de aproximativ 39%.

7.5.2.1. *Ipotezele privind mecanismul fosforilării oxidative* sînt trei, beneficiind fiecare de anumite suporturi experimentale. Prima ipoteză, aceea *a cuplării chimice* (Slater 1966), consideră că prin oxidarea unei substanțe (A_{red}) se formează o legătură covalentă macroergică prin

Scanned with OKEN Scanner

intermediul unui ligant ipotetic X ($A_{ox} \sim X$). Acest complex, în prezența intermediarului $\dot{I}$ va elibera substanța oxidată A_{ox}, formîndu-se un alt complex ($\dot{I} \sim X$). La rîndul său, în prezența fosfatului anorganic din mediu, acest complex va elibera ligantul ipotetic și concomitent se va forma un al treilea complex, între intermediar și fosfatul anorganic ($\dot{I} \sim P_i$). Acest ultim complex va reacționa cu ADP formînd ATP. Reacția decurge conform ecuațiilor :

$$A_{red} + B_{ox} + X \rightarrow A_{ox} \sim X + B_{red}$$

$$A_{ox} \sim X + \dot{I} \rightarrow \dot{I} \sim X + A_{ox}$$

$$\dot{I} \sim X + P_i \rightarrow \dot{I} \sim P_i + X$$

$$\dot{I} \sim P_i + ADP \rightarrow ATP + \dot{I}$$

Deoarece pînă în prezent nu s-a pus în evidență nici intermediarul $\dot{I}$ și nici ligantul X, ipoteza nu a fost întru totul confirmată, deși există date care demonstrează că într-adevăr se formează complexele macroergice $A_{ox} \sim X$, $A_{red} \sim X$ și $\dot{I} \sim X$. De asemenea, această ipoteză nu ia în considerare faptul că procesul fosforilării oxidative necesită prezența obligatorie a membranei mitocondriale.

A doua ipoteză este aceea *a transferului conformațional de energie* (Boyer 1965—1973, Green 1974), mecanism care implică existența complexului ATP-sintetază sau ATP-ază. Conform acestei ipoteze, la nivelul complexului menționat au loc modificări conformaționale, determinate de influențele produse de formele oxidate sau reduse ale transportorilor de electroni care se găsesc la potențiale redox diferite care permit sinteza ATP. Modificările conformaționale ale complexului ATP-sintetază se produc de așa manieră încît favorizează în ordine : acceptarea ADP și P_i, integrarea fosforului anorganic în ATP și eliminarea ATP sintetizat, cu reformarea concomitentă a complexului ATP-sintetază în conformația structurală capabilă de a accepta alte molecule de ADP și P_i. Nici această ipoteză nu ia însă în considerație în măsură suficientă cadrul obligatoriu al desfășurării acestui proces, și anume membrana mitocondrială.

Cea de a treia ipoteză, aceea *a cuplării electrochimice* sau *chemiosmotice* (Mitchell 1966, Greville 1969, Klingenberg, 1975), consideră că transferul electronilor în lungul lanțului respirator se datorește mișcării ionilor prin membrana mitocondrială, de exemplu a ionilor de Na^+, K^+ și Ca^{2+}, care se pot acumula în schimbul ionilor de hidrogen. Prin analogie, aceeași mișcare poate avea loc și în cazul fosforilării oxidative. Ipoteza ia de la început în considerație faptul că procesul de fosforilare oxidativă se petrece în mitocondrie. Ipoteza lui Mitchell, completată ulterior de alți autori, consideră că sinteza ATP este favorizată de potențialul electrochimic creat între faza externă și cea internă a membranei mitocondriei.

7.5.2.2. *Transportul ADP și ATP prin membrana mitocondrială* este un proces dinamic care necesită energie. ADP este considerat ca un factor de reglare a întregii activități mitocondriale, mult intensificată în cazul unei concentrații crescute a acestuia. Raportul ATP/ADP este mai

Scanned with OKEN Scanner

mare în afara membranei mitocondriei, decît în interiorul ei și depinde de potențialul de membrană. Se presupune că există proteine specializate în transportul activ prin membrană a ATP și ADP, modificate conformațional sub acțiunea unor factori, care pot determina astfel eliberarea sau acceptarea specifică și deosebit de rapidă a ATP și ADP.

7.6. SINTEZA GLICOGENULUI

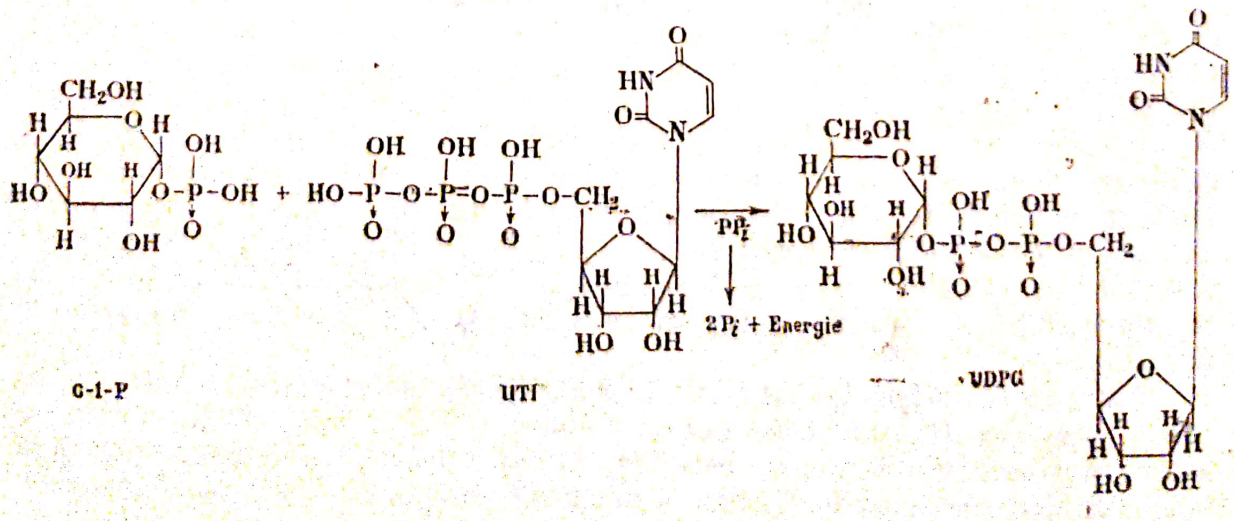
Glicogenul se poate forma fie din glucoză, fie din diverși intermediari, care se pot transforma în glucoză pe calea gluconeogenezei. Ficatul și mușchii conțin cantități importante de glicogen, și anume aproximativ 80, respectiv 250 mg/100 g țesut, iar inima și creierul cantități mult mai reduse. De semnalat lipsa aproape completă a glicogenului din rinichi, fapt explicabil prin posibilitatea acestui organ de a-și reține din sînge cantitatea de glucoză de care are nevoie pentru procesele sale energetice.

Trebuie subliniat faptul că forma de depozit pe care o reprezintă glicogenul este cantitativ limitată, spre deosebire de aceea pe care o reprezintă trigliceridele, practic nelimitată.

Sinteza glicogenului pornește de la glucozo-**6**-fosfat, ester fosforic atît de important prin numeroasele căi metabolice pe care le poate urma. Glucozo-**6**-fosfatul derivă fie direct din fosforilarea glucozei sangvine sub acțiunea hexokinazei sau glucokinazei, fie din diverse surse care pot fi aminoacizi, derivați glucidici sau din lipide.

Enzimele care catalizează sinteza glicogenului se găsesc localizate în organe într-o concentrație care depinde de metabolismul și funcția specifică a fiecăruia, și anume în ordine : ficat, mușchi, iar în cantități mici în inimă și creier. Modalitatea de transformare a G-**6**-P în G-**1**-P sub acțiunea fosfoglucomutazei a fost descrisă anterior.

Din anumite rațiuni energetice, sinteza glicogenului implică o serie de etape în care participă ca donator de energie UTP. Prin condensarea glucozo-**1**-fosfatului cu UTP se formează UDP-glucoza, scindarea acidului pirofosforic furnizînd energia necesară acestei condensări :



Viteza de reacţie depinde de concentraţia G-6-P care dealtfel reprezintă, împreună cu ATP, un efector alosteric al enzimei care determină atît sinteza UDP-glucozei (*UDP-glucozopirofosforilaza*), cît mai ales a enzimei care reglează tot procesul de glicogenogeneză, şi anume *glicogensintetaza*. Această ultimă enzimă se găseşte sub două forme, un tetramer inactiv, glicogensintetaza *b*, şi un dimer activ, glicogensintetaza *a*, care se pot interconverti cu mare viteză sub acţiunea catalizantă a altor două enzime : o fosfatază desface termenul în dimeri activi, iar reacţia inversă, de formare a tetramerului inactiv, este catalizată de o kinază. De remarcat că situaţia este absolut inversă celei descrise în cazul sistemului fosforilazic care participă la degradarea glicogenului.

Activitatea enzimelor care determină deplasarea echilibrului spre formarea unuia din cele două tipuri — activ/inactiv — este coordonată şi reglată deosebit de riguros de o serie de factori : concentraţiile glucozei, glucozo-6-fosfatului, glicogenului, precum şi a 3′,5′-AMP_c, efector a cărui sinteză este la rîndul ei sub strict control hormonal (adrenalină, insulină, glucagon, glucocorticoizi).

UDP-glucoza acţionează ca un donator de grupări glicozil, lanţul glicozidic al glicogenului alungindu-se prin legarea moleculei de glucoză introdusă :

$$\text{UDP-glucoză} + (\text{glucoză})_n \rightarrow \text{UDP} + (\text{glucoză})_{n+1}$$

Legarea se face prin participarea hidroxilului din poziţia 1 a glucozei reformate prin desfacerea hidrolitică a UDP, şi a hidroxilului liber din poziţia 4 a lanţului polizaharidic. Se vor forma astfel lanţuri liniare 1,4 glicozidice. Dar glicogenul fiind puternic ramificat în sinteză mai sînt implicate alte cîteva reacţii. În primul rînd, pentru sinteză este necesară o porţiune de glicogen preformată, un aşa-numit *primer* — matrice de masă moleculară mai mică. De aici sau din lanţuri glicozidice mai lungi, legate 1,4 — din structura glicogenului, sînt desfăcute segmente de 5—6 unităţi de glucoză şi transferate în alte puncte. Legarea segmentelor de glicogen se face între hidroxilul din poziţia 1 a primei unităţi de glucoză a segmentului şi cel din poziţia 6 a lanţului polizaharidic. Această legare, cît şi transferul, sînt catalizate de o enzimă de ramificare numită *glicozil-4,6-transferază*. Nu se cunosc încă factorii care limitează lungirea lanţurilor 1,4, la 6—7 unităţi de glucoză şi nici cum decurge reglarea activităţii transferazei, care, ca şi celelalte enzime ale metabolismului glicogenului, este absorbită pe suprafaţa sferelor de glicogen.

7.7. CICLUL ACIZILOR URONICI

Ciclul acizilor uronici reprezintă o suită de reacţii care conduc la o serie de compuşi de mare importanţă biologică : acizii glucuronic şi galacturonic, lactoza (la femei) sau galactoza. De la UDP-glucoză, care este punctul de plecare în aceste reacţii, se pot urma două căi : una care permite sinteza acidului glucuronic şi metabolizarea sa ulterioară, alta constînd în sinteza galactozei, a acidului galacturonic sau a lactozei.

Scanned with OKEN Scanner

În prima din aceste căi, UDP-glucoza este inițial oxidată la atomul de carbon **6**, formîndu-se o grupare aldehidică, proces în care participă ca acceptor de hidrogen NAD^+; ulterior, printr-o nouă oxidare, gruparea aldehidică se transformă într-o grupare carboxilică, luînd naștere acid UDP-glucuronic. Acest ultim proces de oxidare are loc sub acțiunea enzimatică a citocromului *P*-450 din microzomi. Prin desfacerea UDP, care a avut rolul de a proteja gruparea aldehidică de la atomul de carbon **1**, rezultă acidul glucuronic. Acesta va putea participa la diversele procese care au loc în ficat dintre care pot fi citate : glucuronoconjugarea bilirubinei sau a hormonilor cu structură sterolică, precum și la cele de detoxifiere. De asemenea, acidul glucuronic, ca un component indispensabil al mucopolizaharidelor, va intra în constituția acestora, sinteza avînd loc tot în ficat, organ unde dealtfel se petrece, în exclusivitate, acest proces. De la acidul glucuronic, la majoritatea animalelor dar nu la om, maimuță sau cobai, se poate sintetiza vitamina C. La om, acidul glucuronic se metabolizează în continuare la acidul gulonic care, la rîndul său, se transformă în xiluloză și apoi în xilitol. Atunci cînd ultima etapă este blocată datorită unei deficiențe enzimatice, se produce pentozurie.

Cea de a doua cale conduce la formarea UDP-galactozei. Procesul nclude etape succesive de dehidrogenare și de hidrogenare, la careparticipă NAD^+. UDP-galactoza rezultată se poate condensa cu o moleculă de glucoză, formîndu-se lactoza, procesul decurgînd în totalitate în glanda mamară. De asemenea, prin procese identice celor descrise în cazul sintezei acidului glucuronic, se poate forma acidul galacturonic, o unitate structurală a mucopolizaharidelor.

7.8. GLUCONEOGENEZA

Necesitatea menținerii unei concentrații constante a glucozei sanguine, care condiționează activitatea optimă a tuturor celulelor, face ca acest proces să fie de maximă importanță pentru organism. Deoarece glicogenul hepatic nu este capabil să mențină o glicemie constantă decît maximum 18 ore, în acest proces vor interveni unii precursori ai glucozei (dintre care cei mai importanți sînt acidul lactic, compus al metabolismului glucidic, un număr important de aminoacizi, așa-zișI glucoformatori, și intermediari ai ciclului K r e b s, ca acidul malic).

Gluconeogeneza se desfășoară în special în cele două organe cu specific anabolic, și anume ficatul și rinichiul, deci acest proces nu are loc în toate organele și țesuturile cu aceeași intensitate, deși se desfășoară într-o mare măsură sub acțiunea reversibilă a acelorași enzime care degradează glucoza pe cale glicolitică.

Acidul lactic, format cu precădere în mușchi în cantități dependente de efortul muscular depus, difuzează în sînge, de unde ajunge în cele două organe deosebit de bine irigate — ficatul și rinichii. Aici acidul lactic, sub acțiunea LDH, este transformat în acid piruvic care, pătrunzînd în mitocondrie, poate fi metabolizat fie pe calea ciclului K r e b s, fie pe

Scanned with OKEN Scanner

calea carboxilării sub acțiunea piruvatcarboxilazei; în acest caz se formează acidul oxalacetic, care poate accepta acetil-CoA formînd acid citric sau poate fi hidrogenat formînd acid malic. Acidul malic fiind unul dintre intermediarii metabolici din mitocondrie care poate depăși cu multă ușurință membrana, ajunge în citoplasmă unde este dehidrogenat din nou sub acțiunea malatdehidrogenazei citoplasmatice, acceptorul de hidrogen fiind $NADP^+$. Se formează acidul oxalacetic, care, sub acțiunea decarboxilantă a fosfoenolpiruvatcarboxikinazei și în prezența obligatorie a GTP ca donator de grupări macroergice, formează fosfoenopiruvatul; din acest punct se urmează calea inversă glicolizei pînă la glucozo-6-fosfat.

Piruvatcarboxilaza este o enzimă cu rol de reglare, a cărei acțiune depinde de concentrația acetil-CoA. Bioxidul de carbon pentru carboxilarea acidului piruvic este adus de biotină, în calitate de coenzimă a acestei enzime. Enzima a fost localizată și în fracțiunea citoplasmatică, dar într-o proporție care reprezintă maximum 15% din totalul activității sale.

Activitatea fosfoenolpiruvatcarboxikinazei depinde de concentrația citoplasmatică a acidului oxalacetic, de raportul ATP/ADP și de concentrația glucozei. De remarcat faptul că în mitocondriile celulelor hepatice a fost pusă în evidență o activitate apreciabilă a acestei enzime, care are ca efect sinteza fosfoenolpiruvatului, acesta putînd difuza cu ușurință în citoplasmă, metabolizîndu-se ulterior pe calea gluconeogenezei.

Imediat după acidul lactic, ca importanță în ceea ce privește sursa primară de sinteză a glucozei, se situează aminoacizii glucoformatori. Se numesc aminoacizi glucoformatori acei care pot forma, în urma unor metabolisme particulare, diverși intermediari ai ciclului K r e b s, produși care în stări de urgență pot fi metabolizați preferențial spre formarea de glucoză. Calea urmată de la ciclul K r e b s spre fosfoenolpiruvat este cea descrisă în cazul anterior.

Fosfoenolpiruvatul, rezultat pe seama acidului lactic sau a aminoacizilor glucoformatori, se metabolizează pe calea inversă glicolizei, prin intermediul acelorași enzime, ajungîndu-se însă la o nouă etapă limitantă, aceea de trecere a F-1,6-P la F-6-P.

Enzima care catalizează această reacție în gluconeogeneză este fructozo-1,6-fosfataza (în glicoliză intervine fosfofructokinaza), enzimă alosterică, tetramer cu mai multe izoenzime, care este inhibată de AMP și activată de ATP, fiind localizată numai în ficat și rinichi.

Este de menționat că, în funcție de necesități, acizii grași pot înlocui gradat glucoza în organele unde este posibilă obținerea energiei și din alte substanțe (inimă, mușchi, rinichi, plămîni), menajîndu-se astfel rezervele de glucoză în vederea utilizării lor în mod prioritar de către creier, hematii și suprarenală.

Celelalte monozaharide se metabolizează prin intercalarea lor în secvența glicolitică, procesele avînd loc mai ales în ficat, primul organ care vine în contact cu monozaharidele exogene, absorbite după digestie. Tot ficatul este organul care transformă, la nevoie, glucoza în oricare monozaharid necesar sintezei diferitelor componente celulare, de exemplu sinteza endogenă a ribozei pe calea pentozofosfaților sau sinteza galactozei, avînd ca precursor UDP-glucoza.

Scanned with OKEN Scanner

Metabolismul glucidic, la fel ca şi toate celelalte metabolisme, se găseşte sub un control riguros şi continuu. Factorii care participă la această reglare pot influenţa viteza de metabolizare, direcţia metabolică spre care sînt îndreptaţi diferiţii intermediari şi capacitatea de mobilizare sau de depunere în raport cu lipsa sau excesul de substanţe cu rol energetic.

Schema următoare evidenţiază cît de complexe sînt procesele la care participă glucoza sanguină, creindu-se în acelaşi timp imaginea extremei eficacităţi a mecanismelor de reglaj, astfel încît concentraţia sanguină a glucozei să rămînă în limitele cunoscute (fig. 47):

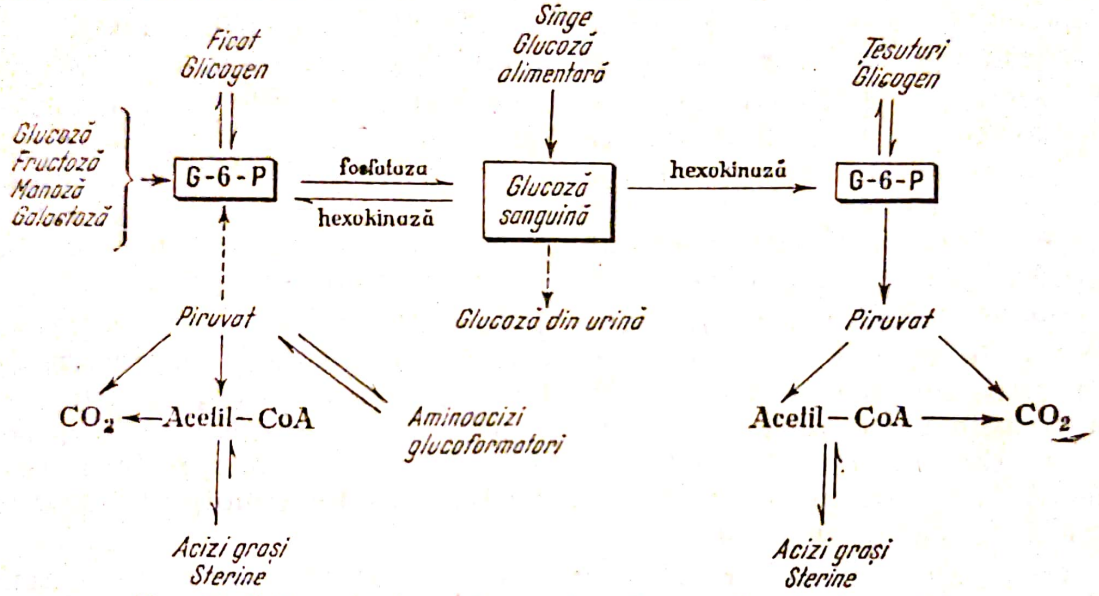


Fig. 47. Utilizarea glucozei sangvine şi mecanismele de reglaj ale concentraţiei sale.

Principiile generale ale proceselor de reglare ale metabolismului glucidic prezentate mai jos pot fi funcţionale în toate metabolismele, evident cu o serie de particularităţi de la metabolism la metabolism şi de la organ la organ.

Controlul prin efectori metabolici. Toate punctele-„cheie" ale unui metabolism dat sînt controlate de enzime-„cheie", situate de obicei la începutul procesului metabolic şi în punctele de ramificare ale acestuia. Toate enzimele cu asemenea rol au structuri alosterice; asupra lor acţionează diverşi efectori, a căror structură chimică, relativ simplă, este total diferită de aceea a substratului asupra căruia acţionează enzima putînd fi: compusul iniţial al căii metabolice (glucoza), termenii finali (acidul piruvic), intermediarii metabolici din puncte-cheie (G-6-P, F-1,6-P), nucleotid-fosfaţi (ATP, ADP, AMP, GTP, AMP_c), coenzime (NAD^+, NADH). Ultimii compuşi îndeplinesc rol de efectori nu numai în cadrul metabolismului glucidic, ci şi în alte metabolisme.

Controlul hormonal. Acest control este exercitat specific asupra organelor-ţintă, dependent de semnalele primite de organele cu secreţie internă ca răspuns la: excesul de substrat, lipsa de substrat, stressuri, urgenţe de diferite naturi, homeostazie (menţinerea între anumite limite a unor indici

Scanned with OKEN Scanner

biochimici importanţi). Raportul în care se găsesc hormonii cu acţiune antagonistă este mai important decît cantitatea lor individuală (de exemplu, raportul insulină/glucagon).

Cele două procese de control menţionate sînt însă aşa de intricate, încît nu pot fi demarcate net decît din necesităţi strict didactice şi acţionează prin mai multe mecanisme de bază posibile, şi anume :

— activitatea sau frînarea activităţii enzimatice prin modificări conformaţionale ale moleculei protein-enzimei care determină acceptarea şi legarea mai rapidă sau mai lentă a substratului ;

— posibilitatea transformării unor enzime dintr-o formă activă într-una nactivă sau invers, printr-o reacţe reversibilă (fosforilază, glicogensintetază) : modificarea *p*H-ului mediului, cu efecte asupra conformaţiei enzimelor care influenţează direct centrul catalitic în sens pozitiv sau negativ (fosfofructokinază) ;

— modificarea interrelaţiilor enzimelor cu acţiune antagonistă, dispuse în complexe moleculare (perechile de enzime care acţionează în glicoliză sau în gluconeogeneză ca fosfofructokinază/fructozo-**1,6**-fosfatază sau piruvatkinază/fosfoenolpiruvatcarboxikinază) ;

— modificarea specifică a raportului izoenzimelor, care pot prezenta forme multiple moleculare (LDH, piruvatkinază, hexokinază) ;

— modificarea afinităţii de legare a enzimelor de componentele macromoleculare sau structurale, şi anume de biopolimeri (glicogen) sau de formaţiuni subcelulare (mitocondrii, membrană), (hexokinază, fosfofructokinază, fosforilază, glicogensintetază).

Utilizarea extrahepatică a glucozei are loc în muşchi sau în ţesutul adipos şi este insulinodependentă, în timp ce redistribuirea din ficat spre creier sau alte organe este un proces insulino-nedependent.

Pătrunderea glucozei sanguine în celule şi formarea G-**6**-P, etapă-cheie în metabolismul glucidic, este controlată de o serie de factori, specifici fiecărui organ, cum ar fi următorii :

— gradul de permeabilitate a ţesuturilor faţă de glucoză, care este dependent de fluxul sangvin total ;

— concentraţia sangvină a glucozei (glicemia) ;

— tipul de izoenzimă a hexokinazei ;

— cantitatea de ATP (necesar fosforilării) disponibil în momentul dat ;

— viteza de metabolizare a G-**6**-P, care în exces constituie un inhibitor al hexokinazei ;

— hormonii care acţionează direct cum sînt : adrenalina, insulina, glucagonul şi glucocorticoizii.

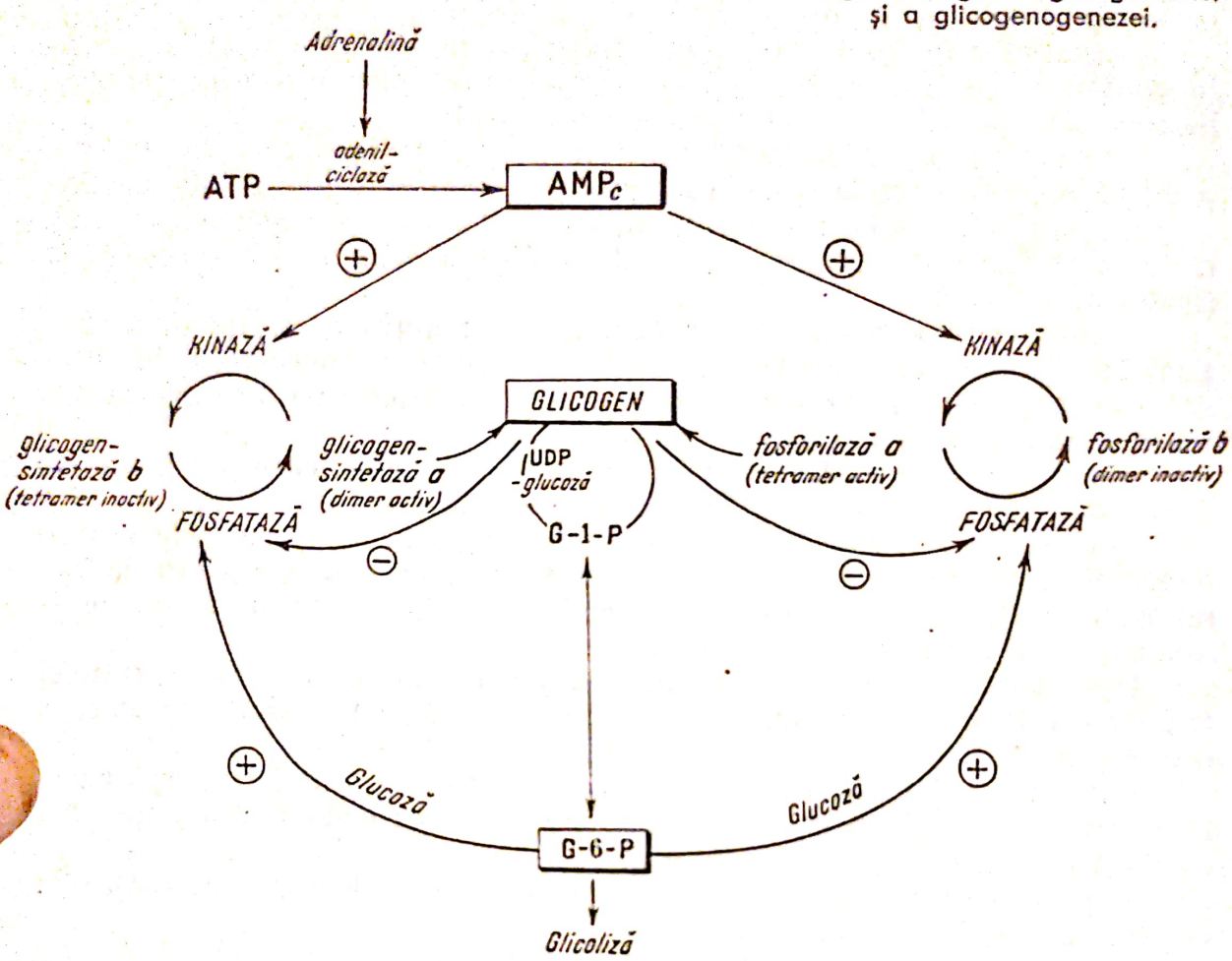
7.9.1. REGLAREA GLICOGENOLIZEI ŞI GLICOGENOGENEZEI

Reglajul celor două procese este dificil de discutat separat datorită numeroaselor lor intricaţii.

Glicogenogeneza este calea de depunere sub formă de glicogen a excesului de glucoză, iar glicogenoliza reprezintă modalitatea de formare rapidă a unei cantităţi de glucoză ca răspuns la o urgenţă energetică (efort fizic sau intelectual) ; desfacerea unităţilor de glucoză se face de 10—50 de ori mai repede decît integrarea lor în glicogen. Din punct de vedere hormonal, procesele sînt reglate de glucocorticoizi, dar şi de insulina care acţionează opus adrenalinei şi glucagonului. Din punct de vedere al reglării

proceselor o importanţă deosebită au şi efectele produse de concentraţiile substratelor respective, şi anume glucoza şi glucozo-6-fosfatul. La acestea se adaugă comportarea opusă a celor două sisteme enzimatice participante, cel fosforilazic şi cel al glicogensintetazei.

Fig. 48. Reglarea glicogenolizei şi a glicogenogenezei.



Factorii menţionaţi îşi coordonează activitatea în „cascada" reacţiilor declanşate de acţiunea hormonilor. Efectul hormonal al adrenalinei este cel mai bine cunoscut ; ea va activa iniţial enzima care produce sinteza AMP_c şi anume *adenilciclaza*, iar produsul rezultat — AMP_c — va determina simultan activarea catabolismului şi inhibarea anabolismului glicogenului, precum şi activarea simultană a ambelor kinaze (fig. 48). Activarea celor două kinaze sub acţiunea AMP_c va avea drept consecinţă favorizarea formării fosforilazei *a* (forma activă) şi a glicogensintetazei *b* (forma inactivă). În acelaşi timp concentraţiile crescute de glicogen vor inactiva fosfatazele celor două sisteme şi vor îndrepta echilibrele spre apariţia formei active a fosforilazei şi spre cea inactivă a glicogensintetazei, iar concentraţiile crescute de glucoză le vor îndrepta în sensurile opuse.

7.9.2. REGLAREA GLICOLIZEI

Unul dintre cele mai fine mecanisme de reglare îl constituie raportul concentraţiilor ATP/ADP, AMP, care exprimă producerea ATP ca scop final al glicolizei. Dacă raportul ATP/ADP, AMP se va modifica în sensul

Scanned with OKEN Scanner

creşterii concentraţiei de AMP sau ADP, deci dacă organismul necesită o cantitate sporită de ATP, viteza de degradare glicolitică va fi imediat crescută prin activarea enzimelor limitante, şi anume a fosforilazei *b*, fosfofructokinazei şi piruvatkinazei. Invers, dacă concentraţia ATP este

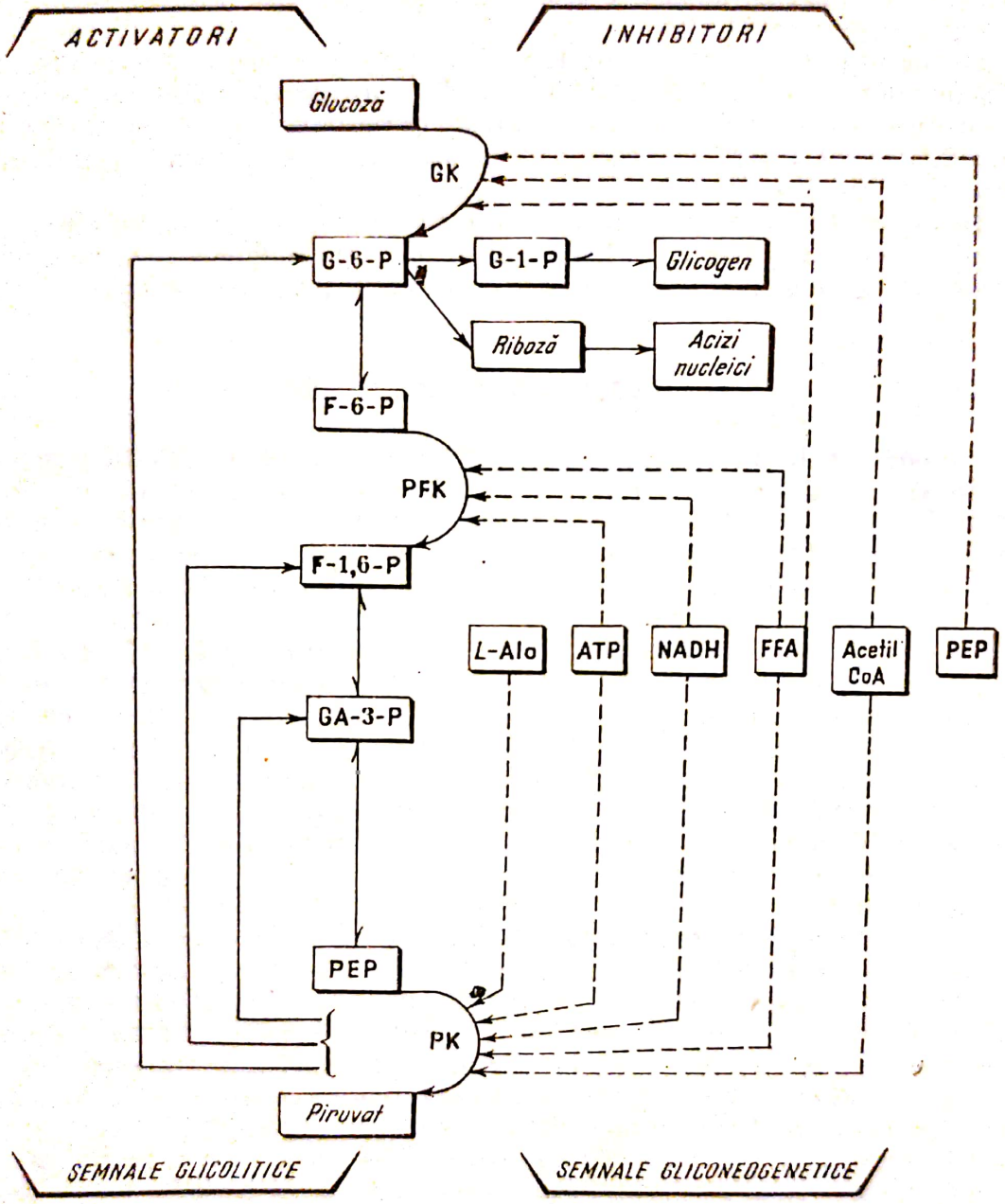


Fig. 49. Reglarea principalelor etape ale glicolizei.

mai mare decît necesităţile din momentul dat, atunci vor fi inhibate glicoliza şi glicogenoliza şi activate gluconeogeneza şi glicogenogeneza prin activarea enzimelor-pereche: fosfoenolpiruvatcarboxikinaza, fructozo-1, 6-fosfataza, glicogensintetaza.

Interrelaţia dintre glicoliză şi respiraţia celulară se manifestă pregnant şi prin influenţe reciproce; concentraţii crescute de intermediari ai ciclului

Scanned with OKEN Scanner

K r e b s vor inhiba glicoliza pentru a se împiedica formarea unui exces de substanţe pentru respiraţie. Această inhibiţie este produsă de acidul citric care, sintetizat în exces, va difuza prin membrana mitocondrială şi va inhiba în mod specific o enzimă limitantă, şi anume fosfofructokinaza. Aşa se explică astăzi efectul P a s t e u r, prin care se înţelege competiţia între glicoliză şi respiraţie.

În strînsă relaţie cu ciclul K r e b s este şi sinteza şi catabolizarea aminoacizilor şi a acizilor graşi liberi. În consecinţă, formarea în exces a unor aminoacizi, ca de exemplu alanina şi fenilalanina, a acetil-CoA sau a acizilor graşi liberi saturaţi sau nesaturaţi, va determina inhibarea promptă a glicolizei.

În figura 49 se prezintă o parte din factorii care reglează în sens pozitiv sau negativ glicoliza, glicogenoliza sau glicogenogeneza, precum şi etapele din gluconeogeneză care au depăşit sinteza fosfoenolpiruvatului.

7.9.3. REGLAREA GLUCONEOGENEZEI

Gluconeogeneza este reglată la fel de riguros ca şi celelalte procese citoplasmatice descrise anterior. Procesul este intensificat ca urmare a inaniţiei sau în cazul scăderii concentraţiei de insulină (diabet) şi este inactivat prin aportul exogen de glucide sau prin administrare/secreţie de insulină. Aceasta deoarece glucoza introdusă prin hrană se oxidează pînă la acid piruvic, care pătrunzînd în mitocondri, se transformă în acetil-CoA, metabolizîndu-se prin ciclul K r e b s. Ritmul ciclului K r e b s este impus evident de cantitatea de ATP necesar a fi sintetizat în momentul dat. Dacă concentraţia acidului piruvic intrat în mitocondrie este mai mare decît necesităţile sintezei de ATP atunci el se va transforma în acid oxalacetic prin carboxilarea sub acţiunea piruvatcarboxilazei. În inaniţie, deci în lipsa aportului de glucoză sau de alţi compuşi glucidici, metabolizarea acidului piruvic va fi îndreptată numai spre formarea acidului oxalacetic, acetil-CoA sintetizîndu-se prioritar din acizii graşi liberi care vor înlocui glucoza.

Activitatea piruvatcarboxilazei, enzimă considerată a fi factorul cel mai eficient al reglării gluconeogenezei, depinde de următorii factori:

— concentraţia acetil-CoA, enzima devenind activă numai în cazul în care există un nivel care depăşeşte posibilitatea de oxidare a acestui compus. De aici explicaţia activării, în unele cazuri, a sintezei corpilor cetonici atunci cînd calea gluconeogenezei este dominantă în mod constant, deci cînd acetil-CoA se formează prin lipoliză;

— concentraţia oxalacetatului care, fiind mai uşor metabolizat de către citratsintetază cu formare de acid citric, se va transforma în fosfoenolpiruvat numai atunci cînd se găseşte în exces. Acest lucru este evident cunoscînd afinităţile faţă de substrat (K_m) ale citratsintetazei şi ale fosfoenolpiruvatcarboxikinazei care sînt, în ordine, de 10 respectiv 50 —100 mM;

— raportul concentraţiilor ATP/ADP, AMP, deoarece citratsintetaza este inhibată de un raport îndreptat în sensul unei concentraţii mai mari de ATP, organismul neavînd nevoie în momentul respectiv de energie. Invers, concentraţiile crescute de ADP vor constitui un factor accelerator al ciclului K r e b s, pentru a se urgenta sinteza de ATP.

Scanned with OKEN Scanner

8 METABOLISMUL LIPIDIC

Din clasificarea făcută în capitolul rezervat descrierii structurii chimice a lipidelor a reieşit că acestea pot fi împărţite în două mari categorii, şi anume în lipide neutre sau simple, avînd ca reprezentanţi de bază trigliceridele şi colesterolul, şi lipide complexe sau fosfolipide, în care sînt incluse glicero- şi sfingolipidele. Structurilor chimice le corespund, din punct de vedere biologic, funcţii specializate. Astfel, trigliceridele reprezintă forma principală de depozit a lipidelor în organism, iar fosfolipidele şi într-o mare măsură colesterolul sînt componente structurale, cu funcţii metabolice şi plastice complexe. Deci de la început trebuie făcută distincţia dintre diferitele roluri pe care le pot avea reprezentanţii lipidelor, deosebind net rolul energetic al trigliceridelor de acela funcţional şi plastic al sfingolipidelor şi colesterolului.

Rolul energetic al lipidelor se confundă cu rolul energizant al acizilor graşi liberi care intră în compoziţia trigliceridelor. Glucidele reprezintă sursa primară de obţinere a energiei, în organismele bine hrănite furnizînd 50% din energia necesară, lipidele 40% şi aminoacizii 10%, dar în inaniţie sau în eforturi fizice susţinute, trigliceridele reprezintă cea mai importantă sursă de obţinere a energiei (80%), înlocuind glucoza. Glucidele se găsesc depozitate în organism într-o cantitate limitată sub formă de glicogen, care nu poate depăşi 500 de g fără lezarea severă a celulelor respective; trigliceridele reprezintă în schimb o formă de depozit practic nelimitată. De asemenea, este de reţinut că în timp ce 1 g de glucoză eliberează 4 000 de calorii, 1 g de trigliceride poate elibera 9 000 de calorii, cu alte cuvinte lipidele constituie o formă de energie condensată.

Rolul structural şi funcţional al lipidelor se datoreşte faptului că fosfolipidele sînt indisolubil integrate în structura membranelor şi a tuturor formaţiunilor subcelulare. Complexele fosfolipoproteice conferă acestora caracteristici funcţionale care le permit să aibă proprietăţi compatibile cu viaţa. De asemenea, fosfolipidele, fie integrate în structuri celulare, fie libere, participă direct la transmiterea impulsului electric de-a lungul fibrelor nervoase. În aceste condiţii devine evident că fosfolipidele deţin un rol funcţional şi nu energetic. Colesterolul, deşi este încadrat după clasificările chimice alături de trigliceride, are un rol care se apropie şi uneori se confundă cu acela al fosfolipidelor.

Scanned with OKEN Scanner

Digestia și absorbția lipidelor are loc practic în totalitate la nivelul lumenului intestinal, procesul constînd din trei etape distincte : *emulsionarea* sub acțiunea acizilor biliari, *hidroliza* produsă de lipaza pancreatică și *constituirea de micelii* și ulterior de chilomicroni.

Prin emulsionarea sub acțiunea acizilor biliari se obțin picături de lipide cu un diametru de 500—1 000 mμ, favorizîndu-se astfel acțiunea ulterioară a lipazei pancreatice, enzimă a cărei activitate este dealtfel stimulată de prezența acizilor biliari. Sub acțiunea lipazei pancreatice, trigliceridele sînt transformate în digliceride și mai ales în **2**-monoacilglicerol, lipaza desfăcînd în mod preferențial radicalii acil din pozițiile **1** și **3** ale glicerolului. Fosfolipidele, prezente într-o proporție de aproximativ 10% din totalul lipidelor alimentare, eliberează elementele constitutive sub acțiunea fosfolipazelor, lizolecitinazelor și a sfingomielinazelor ; toate aceste enzime necesită pentru activitatea lor prezența sărurilor biliare, localizate de asemenea în intestin.

Absorbția se face după formarea prealabilă a unor micelii simple sau mixte între sărurile biliare, pe de o parte, și acizii grași liberi cu mai mult de zece atomi de carbon, **2**-β-monogliceride, colesterol, lizofosfolipide și fosfolipide pe de altă parte. Miceliile sînt rapid absorbite și metabolizate de mucoasa intestinală, aici producîndu-se o resinteză a trigliceridelor în proporție de 90% prin reacilarea **2**-β-monoacilgliceridelor ; într-o proporție mai mică, 50—60%, are loc și resinteza fosfolipidelor.

În mucoasa intestinală se formează simultan chilomicronii, agregate mixte constituite din 2% proteine și 98% lipide diverse ; 90% din acestea sînt trigliceride, 4% fosfolipide, 2% colesterol liber și 4% colesterol esterificat. Chilomicronii se absorb și circulă prin sistemul limfatic, atingînd o concentrație maximă după 2—3 ore de la masă. Din limfă, chilomicronii ajung la diferite organe, fiind metabolizați în ordinea : țesut adipos (40%), ficat (20%), plămîn (20%) și apoi mușchi și rinichi. Fiecare organ utilizează în mod specific componentele din chilomicroni, preluînd în unele cazuri numai trigliceridele, așa cum procedează inima și mușchii. Hidroliza trigliceridelor din structura chilomicronilor este făcută de o lipoproteinlipază specifică.

După cum s-a arătat și în cazul metabolismului glucidic, nici metabolismul lipidic nu se desfășoară identic în toate organele și țesuturile, acestea prezentînd diferențieri specifice. Astfel, țesutul adipos are rol atît în depozitarea, cît și în sinteza și hidroliza compușilor depozitați (trigliceridele), ficatul sintetizează fosfolipidele, esterifică colesterolul, sintetizează acizii grași endogeni, determină interconversiunea unor sfingolipide și sintetizează și metabolizează lipoproteinele ; sîngele reprezintă mijlocul de transport de la și spre toate organele, iar în ficat, rinichi, mușchi, inimă, plămîn, țesut adipos se obține energie prin oxidarea acizilor grași.

Forma de circulație prin sînge a lipidelor este reprezentată de lipoproteinele serice. Datorită caracterului lor puternic hidrofob, lipidele nu sînt vehiculate ca atare de sînge, ci sub forma unor complexe solubile cu proteinele serice. Fracțiunile proteice care se unesc cu lipidele fac parte din categoria α- și β-globulinelor și a albuminei. Deoarece lipidele au o densitate mai mică decît a apei, cu cît raportul lipide/proteine în complexe crește, densitatea lipoproteinelor scade.

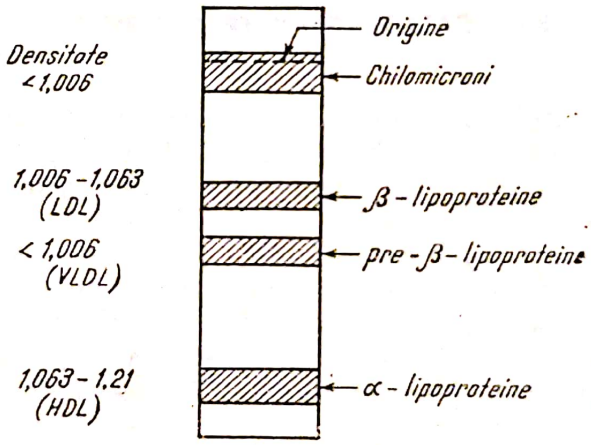
În ser se disting cinci tipuri de lipoproteine ; primul tip este constituit din albumină și acizi grași liberi, reprezentînd forma principală de transport

Scanned with OKEN Scanner

de la ţesutul adipos spre organele care vor oxida acizii graşi cu producere de energie sau de la ficat, organ în care are loc sinteza lor endogenă, spre ţesutul adipos, unde vor fi depozitaţi sub formă de trigliceride. Celelalte patru lipoproteine serice sînt, în ordine: chilomicronii, β-lipoproteinele, pre-β-lipoproteinele şi α-lipoproteinele. Acestea se găsesc în raporturi diferite cu proteinele serice, şi anume o parte proteine şi 99 părţi lipide în cazul chilomicronilor, 10/90 în cazul pre-β-lipoproteinelor, 20/80 şi 35/65 în cazul celorlalte două, şi vor avea prin urmare densităţi care cresc de la chilomicroni la α-lipoproteine. De aici denumirile sub care sînt cunoscute astăzi: lipoproteine cu densitate foarte mică (*very low density lipoproteins*, *VLDL*), lipoproteine cu densitate mică (*low density lipoproteins*, *LDL*) şi lipoproteine cu densitate mare (*high density lipoproteins*, *HDL*). Aceste fracţiuni se obţin prin ultracentrifugare.

Proteinele din compoziţia celor cinci fracţiuni diferă şi prin încărcarea electrică. De aceea, lipoproteinele migrează cu viteze diferite în cimp electric (electroforeză).

În stări fiziologice normale, lipoproteinele serice prezintă constanţă din punct de vedere cantitativ şi calitativ, abaterile avînd o semnificaţie clinică de cea mai mare importanţă, deoarece sînt corelate cu unele afec-



Fracţiune	Densitate	Compoziţie %				
		Proteine	Lipide totale	Trigliceride	Fosfolipide	Colesterol
Chilomicroni	< 0,96	1	99	88	8	4
VLDL (pre-β-lipoproteine)	0,96 - 1,006	7	93	56	20	23
LDL (β-lipoproteine)	1,006 - 1,063	11 - 21	89 - 79	29 - 13	26 - 28	43 - 58
HDL (α-lipoproteine)	1,063 - 1,21	33 - 57	67 - 43	16 - 13	43 - 46	41 - 35
				La % din lipide totale		

Fig. 50. Separarea electroforetică a lipoproteinelor plasmatice şi compoziţia diverselor fracţiuni.

Scanned with OKEN Scanner

ţiuni grave. În figura 50 se prezintă aspectul unei lipidograme normale, ca şi compoziţia lipoproteinelor serice.

Din figură reiese conţinutul mare al trigliceridelor în chilomicroni şi pre-β-lipoproteine (*VLDL*), al colesterolului în β-lipoproteine (*LDL*) şi repartizarea aproape uniformă a fosfolipidelor în *VLDL*, *LDL* şi *HDL*. Lipoproteinele sînt sintetizate mai ales la nivelul ficatului şi desfăcute în componente şi metabolizate la nivelul tuturor organelor şi ţesuturilor sub acţiunea lipoproteinlipazei care acţionează şi asupra chilomicronilor.

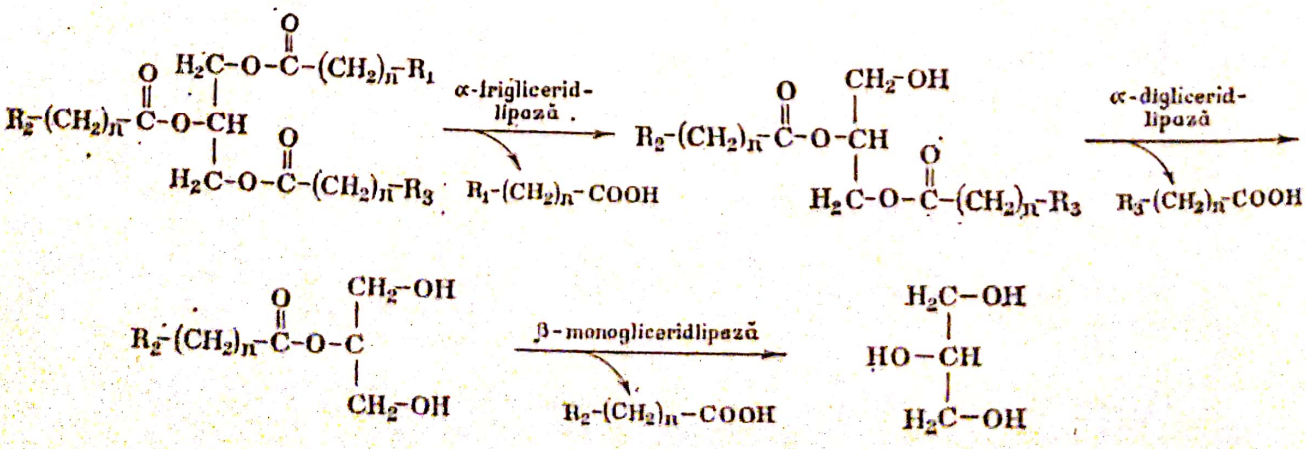
8.1. METABOLISMUL TRIGLICERIDELOR

Importanţa acestui metabolism rezidă în primul rînd în faptul că viteza cu care se obţine energia în organism depinde de substanţa oxidabilă, acizii graşi liberi fiind compuşii de la care energia se eliberează în modul cel mai rapid, urmînd în ordine trigliceridele, glucoza, glicogenul muscular, glicogenul hepatic, proteinele.

8.1.1. CATABOLISMUL TRIGLICERIDELOR

Catabolismul trigliceridelor sau *lipoliza* începe cu hidroliza, proces prin care se eliberează glicerol şi acizi graşi ; hidroliza are loc cel mai activ la nivelul ţesutului adipos, care dispune de două sisteme enzimatice pentru hidroliză : unul acţionează asupra trigliceridelor la nivelul ţesutului, al doilea, constituit din lipoproteinlipază (factorul lipazic de clarifiere), acţionează asupra trigliceridelor din lipoproteinele serice şi chilomicroni. Ultima enzimă este activată de heparină, favorizînd fixarea acizilor graşi din trigliceridele serice la nivelul altor ţesuturi şi organe, ca : inimă, plămîn, medulosuprarenală, glanda mamară (în lactaţie) etc. Excepţie face doar ficatul.

Primul sistem, cel mai important, este alcătuit din trei lipaze distincte, şi anume o *trigliceridlipază*, hormono-sensibilă şi care constituie o etapă limitantă a vitezei lipolizei din ţesutul adipos, o *digliceridlipază* şi o *monogliceridlipază* :



Acizii graşi formaţi trec în sînge unde circulă legaţi de albumină, sau se reesterifică, rămînînd în ţesutul adipos. Glicerolul obţinut fiind o substanţă solubilă circulă prin sînge ca atare.

8.1.1.1. *Catabolismul glicerolului* începe cu fosforilarea sub acţiunea unei *glicerokinaze*, enzimă ce se găseşte în ficat ; α-glicerofosfatul format se transformă prin dehidrogenare — sub acţiunea unei enzime NAD^+-dependente — în gliceraldehid-3-fosfat, care se poate integra în calea de degradare glicolitică.

8.1.1.2. *Catabolismul acizilor graşi saturaţi* cu număr par de atomi de carbon implică o serie de procese complexe, corelate cu sistemul fosforilării oxidative în scopul obţinerii energiei. În lumina celor discutate în capitolul anterior se poate conchide că sediul catabolismului acizilor graşi liberi este mitocondria. Prin urmare, prima etapă a metabolismului acizilor graşi liberi o constituie mecanismul prin care aceştia pătrund în mitocondrie.

Într-o etapă preliminară se produce activarea acidului gras, prin consum de ATP şi de GTP, în prezenţa CoA şi sub acţiunea catalitică a unei enzime denumită *aciltiokinază*.

Activarea se produce astfel :

$$ATP + R-(CH_2)_n-COOH \xrightarrow{\text{acil-tiokinază}} R-(CH_2)_n-C(=O)\sim AMP + PP_i$$

$$R-(CH_2)_n-C(=O)\sim AMP + HS-CoA \xrightarrow{\text{acil-tiokinază}} R-(CH_2)_n-C(=O)\sim S-CoA + AMP$$

$$PP_i \xrightarrow{\text{pirofosfatază}} 2P_i + \text{Energie}$$

Acilcoenzima A conţine o legătură tiosterică macroergică, iar prin hidroliza ei se realizează o energie liberă standard $\Delta G^\circ = -7500$ calorii. Această legătură se formează pe seama clivării pirosfosforice a ATP, cît şi a hidrolizei pirofosfatului la 2 P_i, reacţii care se produc practic concomitent.

Activarea acizilor graşi sub acţiunea catalitică a tiokinazei are loc în citoplasmă şi într-o oarecare măsură în microzomii rezultaţi din reticulul endoplasmic. Deoarece membrana mitocondrială nu este permeabilă pentru compuşii acil-CoA care se formează, urmează că această cuplare a acizilor graşi cu CoA se face doar în scopul aducerii acizilor graşi într-o stare capabilă să reacţioneze cu carnitina (betaina acidului β-hidroxi-γ-aminobutiric), în reacţie formîndu-se acilcarnitina :

$$R-(CH_2)_n-C(=O)\sim S-CoA + H_3C-N^+(CH_3)_2-CH_2-CH(OH)-CH_2-COOH \xrightarrow{\text{carnitin-CoA-aciltransferază}}$$

acil-CoA — carnitină

$$H_3C-N^+(CH_3)_2-CH_2-CH(O-C(=O)-(CH_2)_n-R)-CH_2-COOH + HS-CoA$$

acilcarnitină

Acilcarnitina traversează membrana mitocondriilor printr-un mecanism incomplet cunoscut. Energia liberă standard de transfer a acilului fiind mică, legătura între acil și carnitină este și ea macroergică.

În interiorul mitocondriei se reface acil-CoA, pe seama CoA produsă la acest nivel :

$$\text{Acil} \sim \text{carnitină} + \text{CoA-SH} \xrightarrow{\text{aciltransferază}} \text{acil} \sim \text{S-CoA} + \text{carnitină}$$

Cele trei etape pot fi schematizate astfel (fig. 51) :

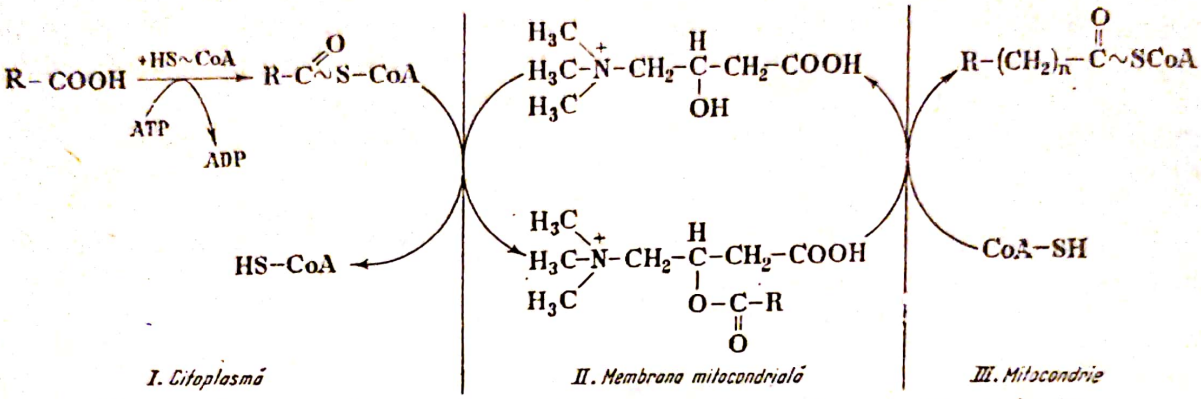
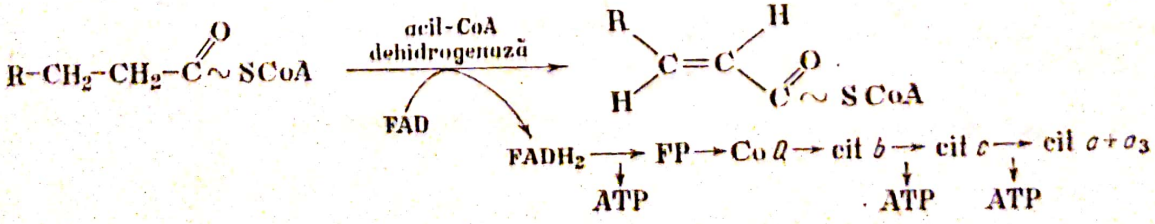


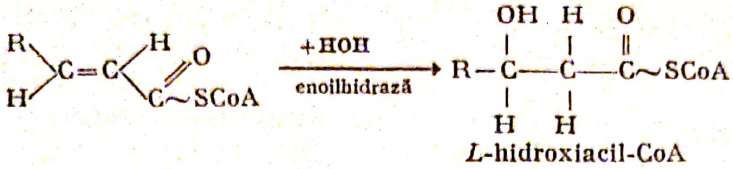
Fig. 51. Mecanismul traversării acizilor grași prin membrana mitocondrială.

Oxidarea acizilor grași activați la nivelul mitocondriei este un proces complex. Primul cercetător care a studiat acest proces a fost K n o o p (1904) ; adăugînd la hrana iepurilor acizi grași marcați cu radical fenil, el identifică în urina acestora acid fenilacetic, rezultat din acizii cu număr par de atomi de carbon și acid benzoic din cei cu număr impar. S-a impus astfel concluzia că acizii grași sînt catabolizați prin fragmentarea lanțului din doi în doi atomi de carbon ca urmare a oxidării. Între 1948—1949, K e n n e d y și L e h n i n g e r stabilesc că această oxidare se produce exclusiv intramitocondrial, iar L y n e n și colab., precum și alți cercetători, identifică și purifică enzimele, stabilind etapele procesului de oxidare.

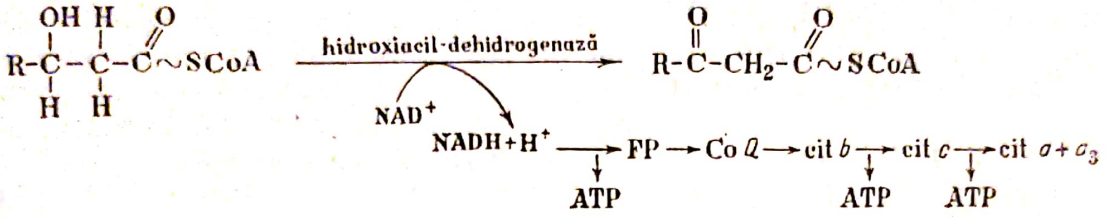
Prima reacție a procesului cunoscut azi sub numele de β-*oxidare* este catalizată de o *acil-CoA-dehidrogenază*, care este o enzimă FAD-dependentă și care se va reoxida în lanțul respirator prin intermediul unei flavoproteine (FP) :



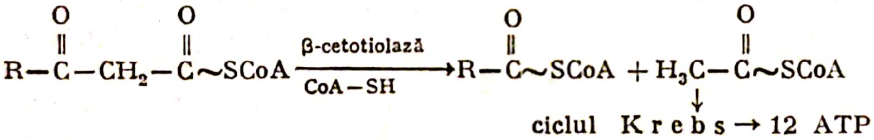
A doua reacție este catalizată de *enoilhidrază* (*crotonază*), care acționează stereospecific formînd stereoizomerul *L* din izomerul *trans* al acil-CoA nesaturat, prin adiție de apă :



A treia reacţie, catalizată de enzima *L-3-hidroxiacildehidrogenază*, care are drept coenzimă NAD^+, prezintă şi ea stereospecificitate, enzima acţionînd numai pe izomerul *L*, cu formarea unui **3**-cetoacil-CoA :



Ultima reacţie a procesului prin care se rupe oxidativ fragmentul de doi atomi de carbon este o *tioliză*, fiind catalizată de β-*cetotiolază*. La reacţie participă o nouă moleculă de CoA, produşii acestei reacţii, care constituie şi produşii întregului proces de β-oxidare fiind un acil-CoA cu doi atomi de carbon mai puţin decît cel iniţial şi o moleculă de acetil-CoA ; acetil-CoA se oxidează în continuare prin ciclul acizilor tricarboxilici şi lanţul respirator pînă la bioxid de carbon şi apă, cu producere de ATP :



Acil-CoA rezultat în prima etapă de degradare constituie compusul cu care începe o nouă etapă în care se parcurg, în aceeaşi ordine, cele patru reacţii etc. Astfel, degradarea completă a palmitil-CoA se realizează în şapte etape succesive, cu formarea a opt molecule de acetil-CoA. Figura 52 redă procesul β-oxidării în etape sub forma unei spirale, aşa cum a fost reprezentat în mod sugestiv de către L y n e n ; fiecare spiră corespunde parcurgerii celor patru reacţii, catena acidului gras scurtîndu-se cu doi atomi de carbon pe seama cărora se formează o moleculă de acetil-CoA.

Procesul de oxidare are loc cu viteză mare în ficat, ţesutul adipos, inimă şi rinichi şi abia cu 1/6 din aceasta în diafragmă, muşchi, creier şi plămîn, iar în intestin şi testicul şi mai lent.

Bilanţul energetic al β-oxidării este diferit de la un acid gras la altul. După cum s-a mai arătat, în cazul oxidării complete a acidului palmitic (16 atomi de C) se obţin opt molecule de acetil-CoA, după ecuaţia :

$$\text{Palmitil-CoA} + 7\ \text{CoA–SH} + 7\ \text{FAD} + 7\ \text{NAD}^+ + 7\ \text{H}_2\text{O} \rightarrow 8\ \text{acetil-CoA} + 7\ \text{FADH}_2 + 7\ \text{NADH} + 7\ \text{H}^+$$

Reoxidarea fiecărei molecule de $FADH_2$ în lanţul respirator furnizează două molecule de ATP, iar de la fiecare $NADH + H^+$ se

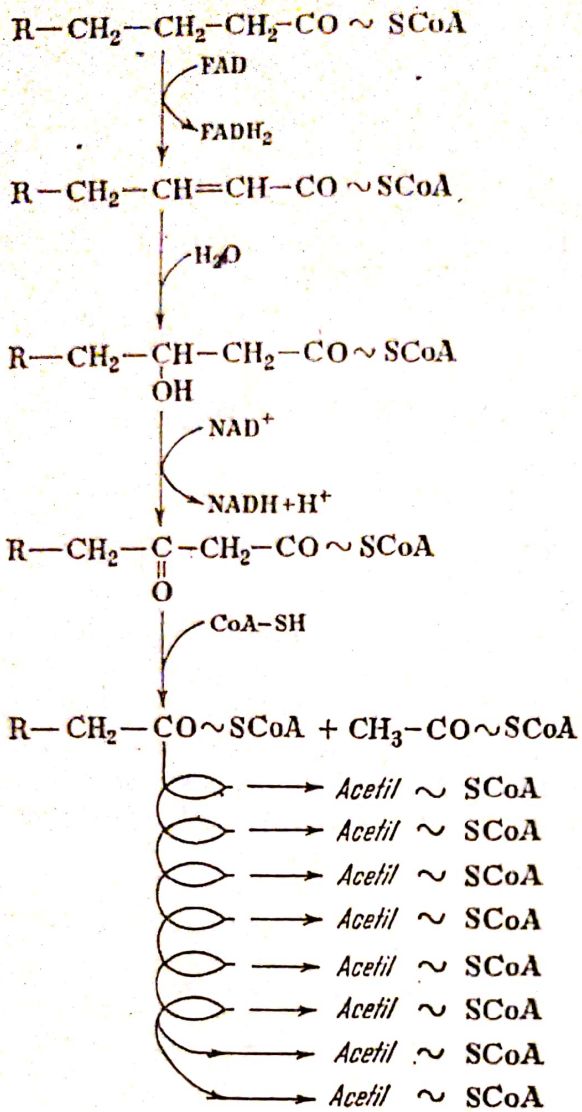
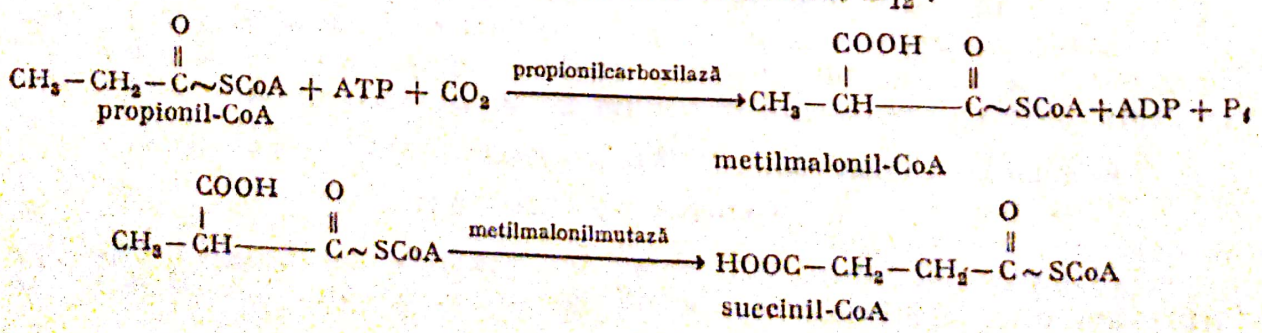


Fig. 52. β-oxidarea acizilor graşi.

obţin cîte trei molecule de ATP, aşa după cum s-a arătat la fosforilarea oxidativă. Deci, în cele şapte etape ale oxidării palmitil-CoA se produc $7 \times 5 = 35$ ATP. Fiecare moleculă de acetil-CoA oxidată în ciclul acizilor tricarboxilici produce 12 ATP, prin urmare cele opt molecule de acetil-CoA rezultate din palmitil-CoA vor forma $8 \times 12 = 96$ ATP. În total: $35 + 96 = 131$ ATP/moleculă de acid palmitic. Deoarece pentru activarea palmitilului s-a consumat în etapa iniţială o moleculă de ATP, producţia netă va fi: $131 - 1 = 130$ ATP, ceea ce corespunde unei energii incluse în legăturile macroergice în valoare de: $130 \times 7{,}30 = 949$ kcal/mol.

Ţinînd seama de faptul că prin oxidarea acidului palmitic la bioxid de carbon şi apă se eliberează −2 380 kcal/mol, printr-un calcul similar celui prezentat la metabolismul glucidic, se ajunge la concluzia că randamentul utilizării energiei obţinute prin β-oxidarea acidului palmitic pentru formarea de legături macroergice este de aproximativ 40%, randament egal cu cel întîlnit în cazul oxidării glucozei.

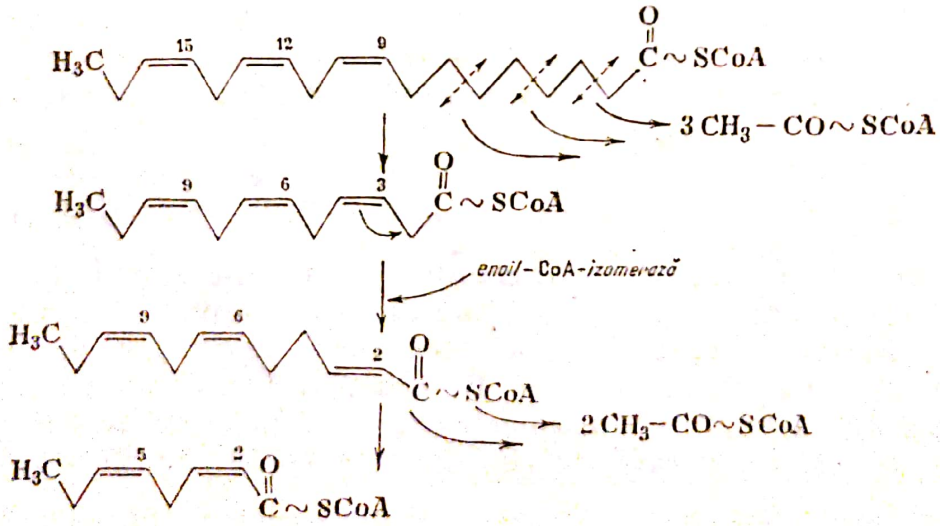
8.1.1.3. *Catabolismul acidului propionic*, care provine prin degradarea oxidativă a acizilor graşi cu număr impar de atomi de carbon sau a aminoacizilor valină şi izoleucină, reprezintă un aspect particular, care scoate însă în evidenţă interrelaţiile dintre metabolisme. Sub acţiunea *propionil-carboxilazei*, o enzimă biotin-dependentă, acidul propionic se carboxilează formînd metilmalonil-CoA, care se izomerizează ulterior în succinil-CoA sub acţiunea *metilmalonilmutazei*. Această enzimă are drept coenzimă 5′-dezoxiadenozilcobalamina, rezultată din vitamina B_{12}:



Deşi din punct de vedere cantitativ, pentru ţesutul animal, metabolismul propionil-CoA reprezintă o cale secundară, el are totuşi o deosebită importanţă deoarece acidul succinic care se formează se integrează în ciclul acizilor tricarboxilici ; în acest mod el poate furniza energie, sau, prin condensarea cu glicina, sintetizează nucleul porfirinic, necesar biosintezei citocromilor şi hematopoezei.

8.1.1.4. *Catabolizarea acizilor graşi nesaturaţi* are loc tot prin β-oxidare, dar necesită o serie de enzime specifice suplimentare. Cunoaşterea căilor prin care se oxidează acizii graşi nesaturaţi este de mare importanţă, pentru că aceştia reprezintă aproximativ jumătate din totalul acizilor graşi ai organismelor animale. Cel mai răspîndit acid gras nesaturat este acidul oleic (18 : 1, Δ**9**), dar bine reprezentaţi cantitativ mai sînt şi acizii palmitoleic (16 : 1, Δ**9**), linoleic (18 : 2, Δ**9, 12**), linolenic (18 : 3, Δ**9, 12, 15**) şi arahidonic (20 : 4Δ **5, 8, 11, 14**).

Sistemele enzimatice suplimentare amintite au rolul de a muta dubla legătură dintr-o poziţie care este incompatibilă cu β-oxidarea, în alta, care există şi în compuşii intermediari ai oxidării acizilor graşi saturaţi. De exemplu, oxidarea acidului linolenic (18 : 3, Δ**9, 12, 15**) şi cu atomii de hidrogen în *cis* faţă de dubla legătură : după ruperea a şase atomi de carbon prin trei β-oxidări succesive se formează un acid cu 12 atomi de carbon care are trei duble legături, şi anume dodecatrienoil-CoA. Prima dublă legătură fiind în poziţia **3-4**, nu mai este posibilă oxidarea în continuare, procesul normal necesitînd formarea unei duble legături în poziţia **2—3**, iar atomii de hidrogen trebuind să fie în *trans*. Intervine însă o izomerază care mută dubla legătură între atomii de carbon **2** şi **3**, iar atomii de hidrogen se vor afla în cazul acesta în *trans*. Urmează încă două β-oxidări în urma cărora se formează un acid cu 8 atomi de carbon şi două duble legături, octodienoil-CoA. După încă două mutări ale celor două duble legături oxidarea este completă :

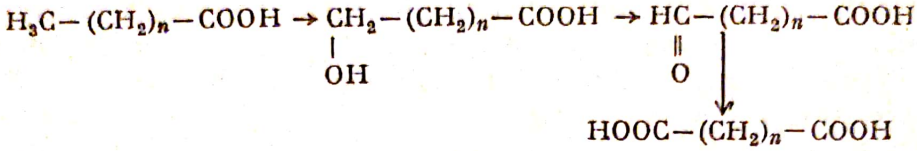


Mutarea dublelor legături se face fără aport exogen de energie.

8.1.1.5. *α- şi ω-oxidarea* constituie alte căi de degradare a acizilor graşi ; aceste mecanisme se desfăşoară în microzomi, sub acţiunea sistemului oxigenazic sau hidroxilazic al citocromului *P*-450, spre deosebire de

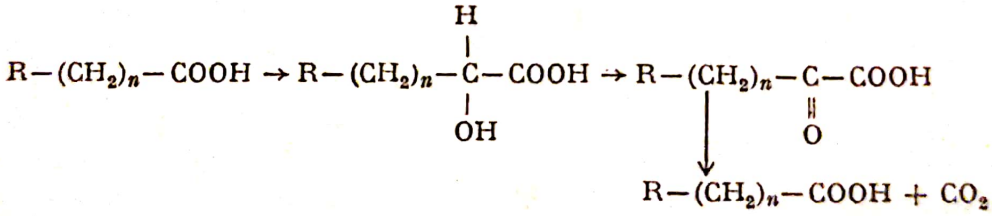
β-oxidare care are loc exclusiv în mitocondri. Prin aceste două căi se ajunge la o serie de compuși care, ulterior, sînt catabolizați prin β-oxidare, cu eliberare de energie.

Prin ω-oxidare se înțelege oxidarea capătului hidrofob al lanțului acizilor grași, respectiv a atomului de carbon al metilului. Procesul, care are loc numai în microzomii ficatului și rinichiului, se desfășoară în mai multe etape : în prima etapă metilul este oxidat la grupare de alcool primar; aceasta este oxidată în continuare la grupare aldehidă și final la grupare carboxil, obținîndu-se deci un acid gras dicarboxilic :

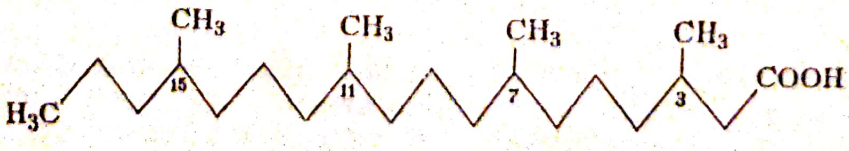


Formarea celei de a doua grupări carboxil permite catabolizarea prin β-oxidare de la ambele capete, prin urmare cu o viteză sporită. De asemenea, ca urmare a formării celei de a doua grupări carboxil, se pot oxida și acizii grași care conțin în poziția α un metil sau o altă funcție care poate împiedica degradarea normală prin β-oxidare. Pe această cale se oxidează aproximativ 3% din totalul acizilor grași.

α-oxidarea constă în oxidarea carbonului învecinat funcției carboxil, formîndu-se α-hidroxiacizi. Pe lîngă aspectul anabolic al acestei căi — formarea unor α-hidroxiacizi de mare importanță biologică, cum sînt acizii cerebronic și nervonic — se distinge și un aspect pur catabolic, constînd în posibilitatea degradării prin β-oxidare a unor acizi care conțin în poziția α un metil. Oxidarea în poziția α implică oxidări și decarboxilări succesive, formîndu-se acizi cu număr impar de atomi de carbon :



Cît de importantă pentru organismul uman este α-oxidarea rezultă și din aceea că boala lui Refsum, o tulburare neurologică gravă, transmisibilă genetic, se datorește unei insuficiențe enzimatice în oxidarea acidului phytanic (acidul **3, 7, 11, 15**-tetrametil-hexadecanoic). Acesta, avînd în poziția β un metil, nu se poate degrada prin β-oxidare și se acumulează, în special în sistemul nervos, determinînd tulburările respective :



acid phitanic

Trigliceridele reprezintă cea mai însemnată rezervă de compuşi oxidabili ai organismului putîndu-se acumula, practic, fără limite. Un tînăr de 25 de ani, normoponderal, are un depozit de trigliceride de aproximativ 8 kilograme pe care le poate utiliza fără lezări celulare, iar la 45 de ani acest depozit ajunge la aproximativ 15 kilograme. La femei depozitele sînt cu 2—5 kilograme în plus. Depozitele de grăsime sînt formate din trigliceride (90%) înglobate în celule specializate, diferenţiate din reticulul care înconjoară vasele de sînge. Ţesutul adipos este bine definit histologic şi este distribuit pretutindeni, chiar şi în muşchi, dar mai ales sub piele, înconjurînd vasele de sînge, sau în cavitatea abdominală.

Ţesutul adipos, considerat mult timp inert din punct de vedere metabolic, are de fapt o activitate intensă, care necesită o bună irigare sanguină şi terminaţii nervoase pentru stimulare. Acest ţesut, care la unii indivizi reprezintă mai mult de jumătate din masa lor corporală este, în ultimul timp, obiectul unor asidui cercetări biochimice.

8.1.2.1. *Sinteza glicerolului* poate porni de la doi intermediari ai glicolizei, şi anume de la dihidroxiacetonfosfat şi gliceraldehid-3-fosfat. Ambii intermediari se transformă în glicerol prin hidrogenare sub acţiunea unor enzime NAD^+-dependente, proces care are loc în citoplasmă. Glicerol-3-fosfatul format va accepta 3 molecule de acil-CoA sub acţiunea unei *aciltransferaze* şi va da naştere triacilgliceridelor respective.

Sinteza este deci dependentă de metabolizarea citoplasmatică a glucozei. Glicerofosfatul se poate forma şi din glicerol liber, sub acţiunea *glicerokinazei*.

8.1.2.2. *Sinteza acizilor graşi* saturaţi are loc mai ales în citoplasma celulelor hepatice şi în ţesutul adipos (în cantităţi mici şi în alte organe) şi în mitocondri sub acţiunea a două sisteme enzimatice distincte, *acetil-CoA-carboxilaza* şi *acidgrassintetaza*. Ambele sisteme sînt complexe enzimatice cu mase moleculare foarte mari — ultimul avînd mai mult de 4 milioane — al căror mod de acţiune a fost elucidat în ultimii 10 ani.

Procesul de biosinteză începe prin carboxilarea acetil-CoA citoplasmatic cu formarea malonil-CoA şi este strict dependent de metabolismul glucidic, deoarece acetil-CoA citoplasmatic are ca origine un intermediar al ciclului K r e b s, acidul citric. Excesul alimentar, de origine glucidică sau lipidică, va genera exces de acid piruvic şi acetil-CoA. Acidul piruvic, difuzînd în mitocondrie, va fi decarboxilat oxidativ cu formare de acetil-CoA, care se condensează cu acidul oxalacetic dînd naştere acidului citric. Dacă acidul citric se va forma într-o cantitate mare, nu va mai putea fi oxidat în totalitate prin ciclul K r e b s care are un ritm de oxidare dependent de cantitatea de energie necesară organismului. Excesul de acid citric va difuza în citoplasmă, unde se va transforma în componentele iniţiale din care s-a format, respectiv acetil-CoA şi acid oxalacetic. Se evită deci pe de o parte o acumulare de acid piruvic, acid citric sau acetil-CoA intramitocondrial, şi pe de alta se separă în celulă sediul sintezei — citoplasma — de acela al degradării — mitocondria (fig. 53) :

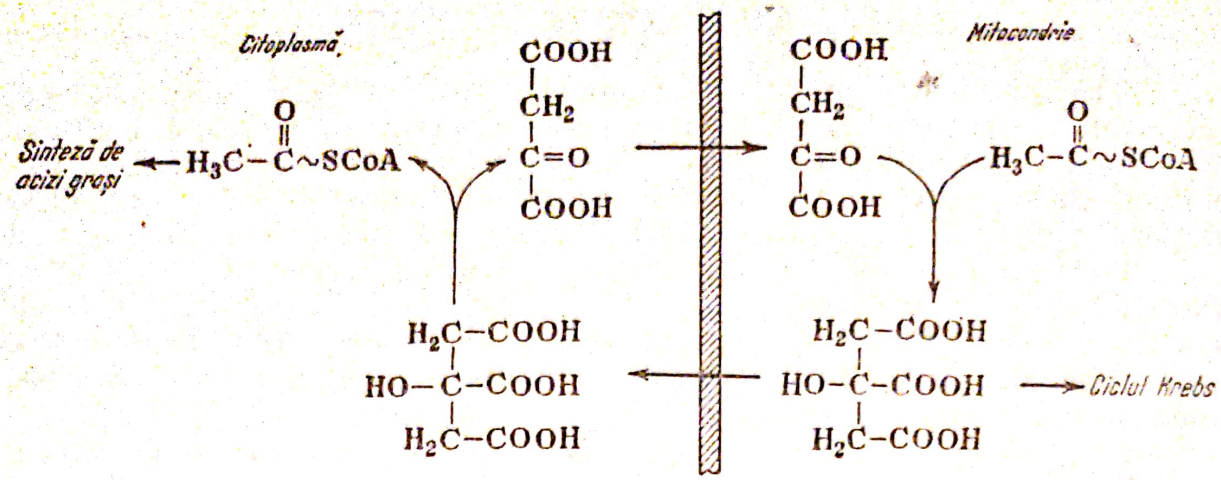
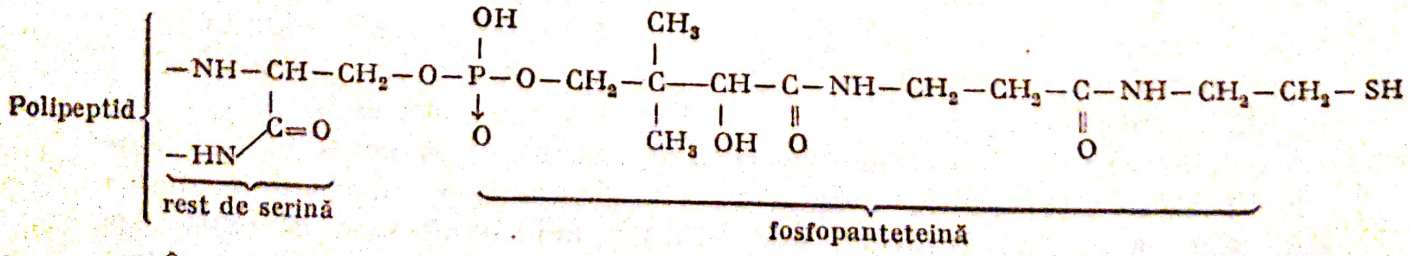


Fig. 53. Participarea acidului citric la biosinteza acizilor graşi.

Acetil-CoA-carboxilaza, enzima care carboxilează acetil-CoA format din acidul citric, poate exista într-o formă inactivă, un protomer cu masa moleculară de 410 000, şi într-o formă activă, un polimer cu masa moleculară cuprinsă între 4 şi 8 milioane, în funcţie de gradul său de agregare. Echilibrul dintre cele două forme este dependent de acţiunea mai multor factori cu rol de reglare. Enzima are drept coenzimă biotina ce poate accepta şi ceda CO_2, şi care este legată de proteină prin legături covalente. Acetil-CoA-carboxilaza are o structură alosterică şi conţine mai multe locusuri specifice de care se leagă substratul, ATP şi acizii tricarboxilici. Activitatea ei este mult frînată în inaniţie, în diabetul aloxanic şi după o hrană bogată în lipide; activitatea este crescută după o hrană cu un conţinut mare în glucide.

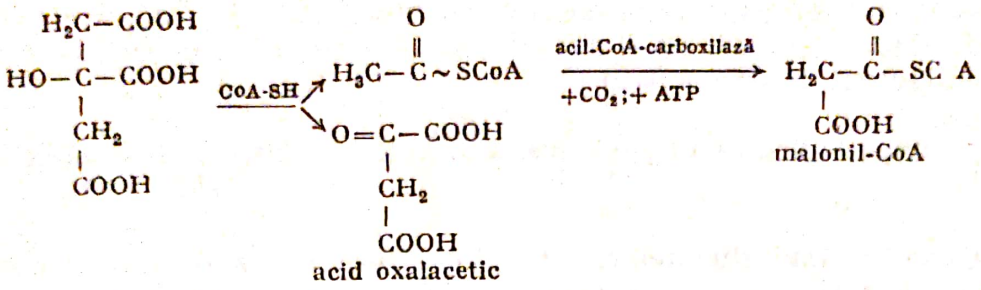
Malonil-CoA, care s-a format prin carboxilarea acetil-CoA, constituie substratul acţiunii celui de al doilea sistem enzimatic — acidgrassintetaza — complex format din 6 enzime distincte şi care are drept component de bază o proteină specifică ce conţine 4′-fosfopanteteina, legată covalent prin intermediul unui rest de serină. Fosfopanteteina posedă o grupare tiolică de care se leagă tioesteric toţi intermediarii asupra cărora acţionează succesiv enzimele din complexul acidgrassintetazei, motiv pentru care a primit denumirea de *proteina transportoare de grupări acil* (PTA) (traducerea termenului anglo-saxon *acyl carrier protein* sau ACP). PTA este o proteină cu masa moleculară de 10 000, cu secvenţa aminoacizilor cunoscută în prezent. Structura proteinei specifice a complexului multienzimatic poate fi reprezentată simplificat astfel :



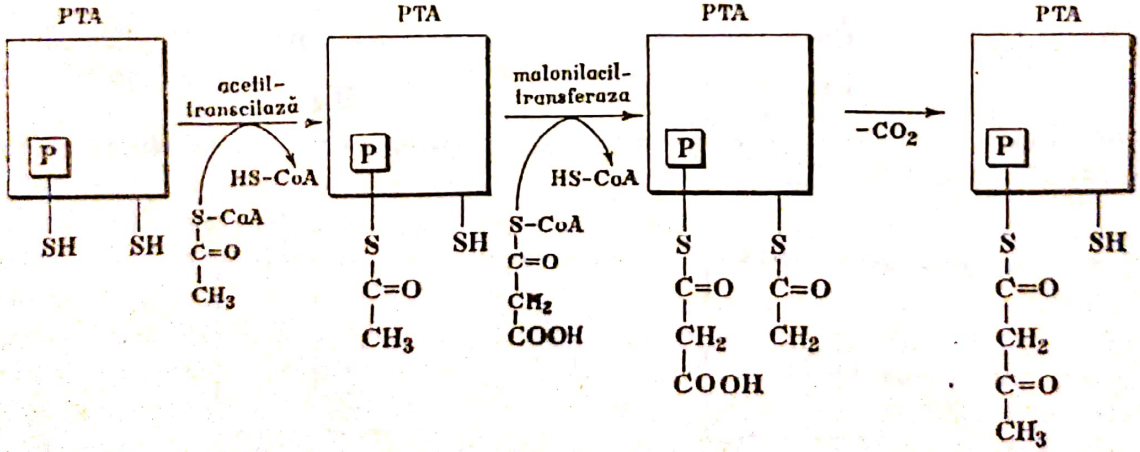
În mecanismul acestui proces, care va fi descris în continuare, un rol important îl deţine, alături de gruparea —SH din radicalul de fosfopanteteină, o a doua grupare —SH aparţinînd unui rest de cisteină din PTA.

Scanned with OKEN Scanner

Ţinînd seama de cele prezentate mai sus, procesul de biosinteză a acizilor graşi, începînd cu biosinteza malonil-CoA, va fi următorul:

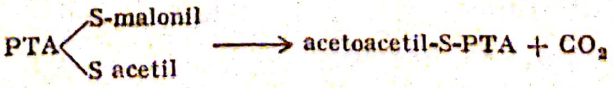


Reacţia următoare, în care se formează acetoacetil-S-PTA, necesită fixarea prealabilă a radicalului malonil şi acetil de PTA. În afara rolului de activare a acestor radicali, 4′-fosfopanteteina din PTA asigură transportul succesiv al substraturilor la nivelul centrilor activi ai enzimelor din complexul acidgrassintetazei. Atît activarea, cît şi transportul se realizează prin intermediul grupării —SH a 4′-fosfopanteteinei, formîndu-se legături tioesterice cu malonil-CoA şi ulterior cu intermediarii formaţi în cursul sintezei. Reacţia de sinteză este amorsată de o singură moleculă de acetil-CoA care, sub acţiunea *acetiltransacilazei*, se fixează pe gruparea —SH a fosfopanteteinei din PTA, eliberîndu-se CoA—SH; concomitent, sub acţiunea *malonilaciltransferazei*, radicalul acetil este deplasat pe cealaltă grupare —SH a PTA, locul radicalului acetil fiind luat de radicalul malonil, astfel că atît acetilul, cît şi malonilul sînt legaţi tioesteric de complexul enzimatic:

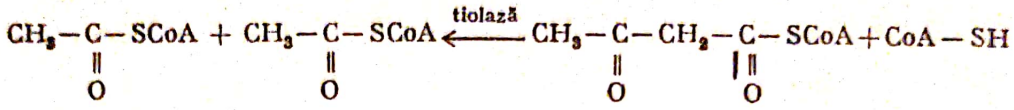


Condensarea radicalilor malonil cu radicalul acetil se face cu eliminare de CO_2, acetoacetilul rezultat rămînînd legat de gruparea —SH a panteteinei.

Reacţia, care în ansamblu poate fi reprezentată prin ecuaţia:

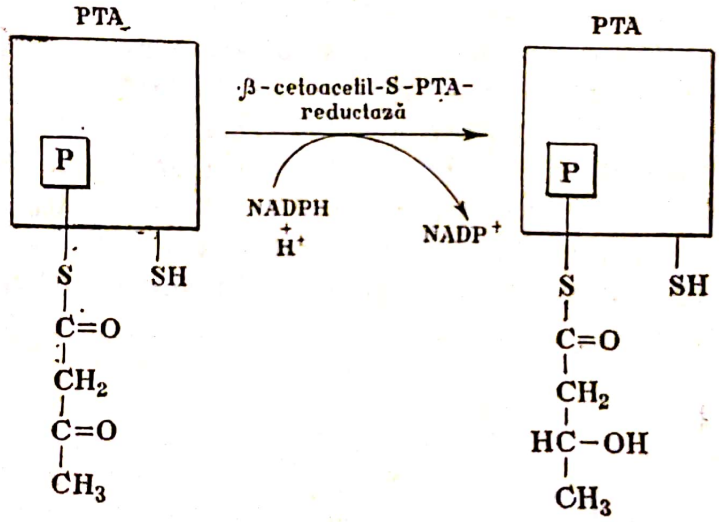


este puternic exergonică, deci cu echilibrul deplasat spre dreapta. În acest mod, legătura C—C se realizează cu eliberarea CO_2 care a servit la formarea malonil-CoA. Dacă acetoacetilul s-ar fi format din două molecule de acetil-CoA prin intermediul tiolazei, reacţia ar fi fost puternic endergonică, deci echilibrul ar fi fost deplasat spre strînga, ceea ce înseamnă un randament foarte scăzut :

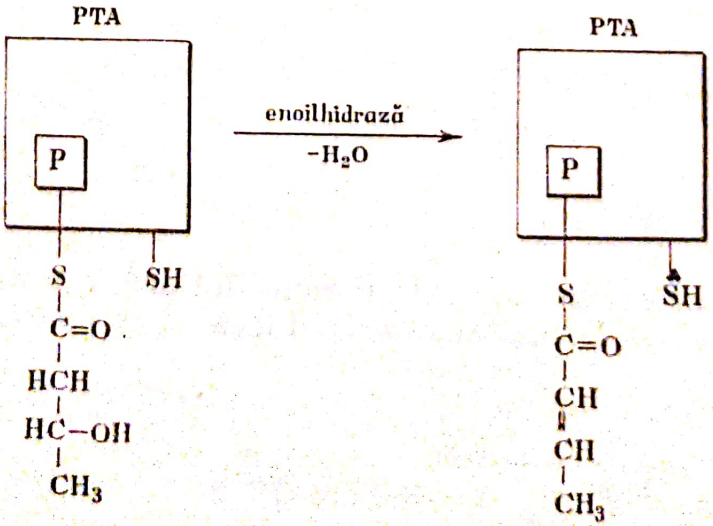


Ca şi în cazul glucidelor, calea de sinteză a acizilor graşi decurge parţial prin reacţii diferite de cele ale căii de degradare. De fapt, în toate cazurile secvenţele care utilizează energie sînt separate de cele care produc energie. Regula este generală şi se reîntîlneşte la metabolismul aminoacizilor, nucleotidelor, proteinelor, acizilor nucleici etc.

În continuare are loc reducerea acetoacetil-S-PTA, reacţia fiind catalizată de β-*cetoacetilreductaza* care are drept coenzimă NADPH ; rezultă β-hidroxibutiril-S-PTA :

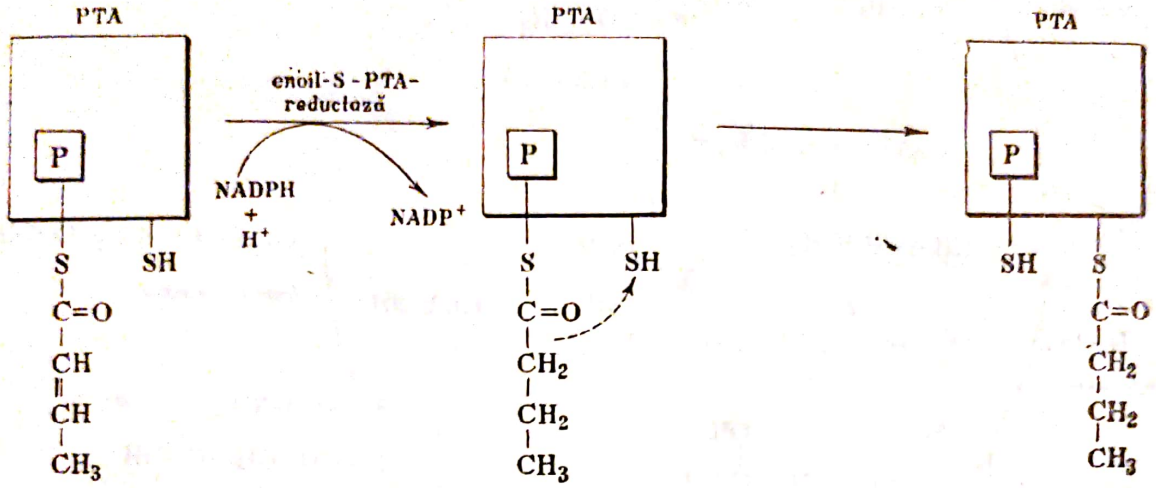


Prin deshidratarea care se produce sub acţiunea unei *enoilhidraze* se formează crotonil-S-PTA :



Scanned with OKEN Scanner

Sub acţiunea *enoil-S-PTA-reductazei*, enzimă NADP+— dependentă, se formează butiril-S-PTA. În această etapă butiril-S-PTA este transferat pe gruparea —SH a proteinei, iar pe cea —SH a pantoteinei se transferă o nouă moleculă malonil-CoA :



Următoarele etape se desfăşoară în mod identic, rezultînd caproil-S-PTA şi prin reluarea lor succesivă se formează lanţul celor 16 atomi de carbon ai acidului palmitic. Ecuaţia globală a biosintezei palmitatului este deci :

$$H_3C-CO\sim S-CoA + 7\ HOOC-CH_2-CH\sim SCoA + 14\ NADPH + 14\ H^+ \rightarrow$$

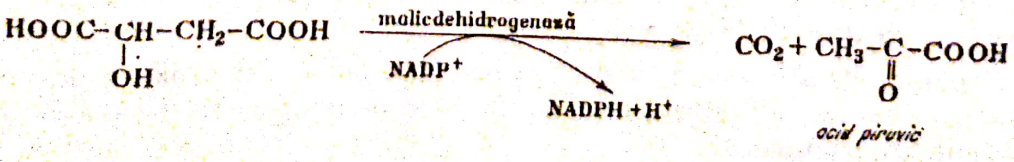
$$\rightarrow CH_3-CH_2-(CH_2-CH_2)_6-CH_2-COOH + 7\ CO_2 + 14\ NADP^+ + 8\ CoA-SH + 6\ H_2O$$

Rezultă că acidul palmitic este format prin condensarea unei molecule de acetil-CoA cu şapte molecule de malonil-CoA.

O reprezentare sugestivă a modului de acţiune a sistemului multienzimatic acidgrassintetază este dată în figura 54.

Cele 14 molecule de NADPH necesare etapelor de reducere pentru sinteza acidului palmitic rezultă pe mai multe căi. Cea mai importantă sursă este legată de oxidarea citoplasmatică a G-6-P pe calea pentozofosfaţilor (v. „Metabolismul glucidic").

În ficat, ţesutul adipos şi glanda mamară (în cursul lactaţiei), unde sinteza *de novo* a acizilor graşi se produce cu o viteză destul de mare, ciclul pentozofosfaţilor este foarte activ. O altă sursă de NADPH o constituie reacţia catalizată de *malatdehidrogenaza* citoplasmatică, de decarboxilare şi oxidare concomitentă a acidului malic cu formare de CO_2 şi acid piruvic :



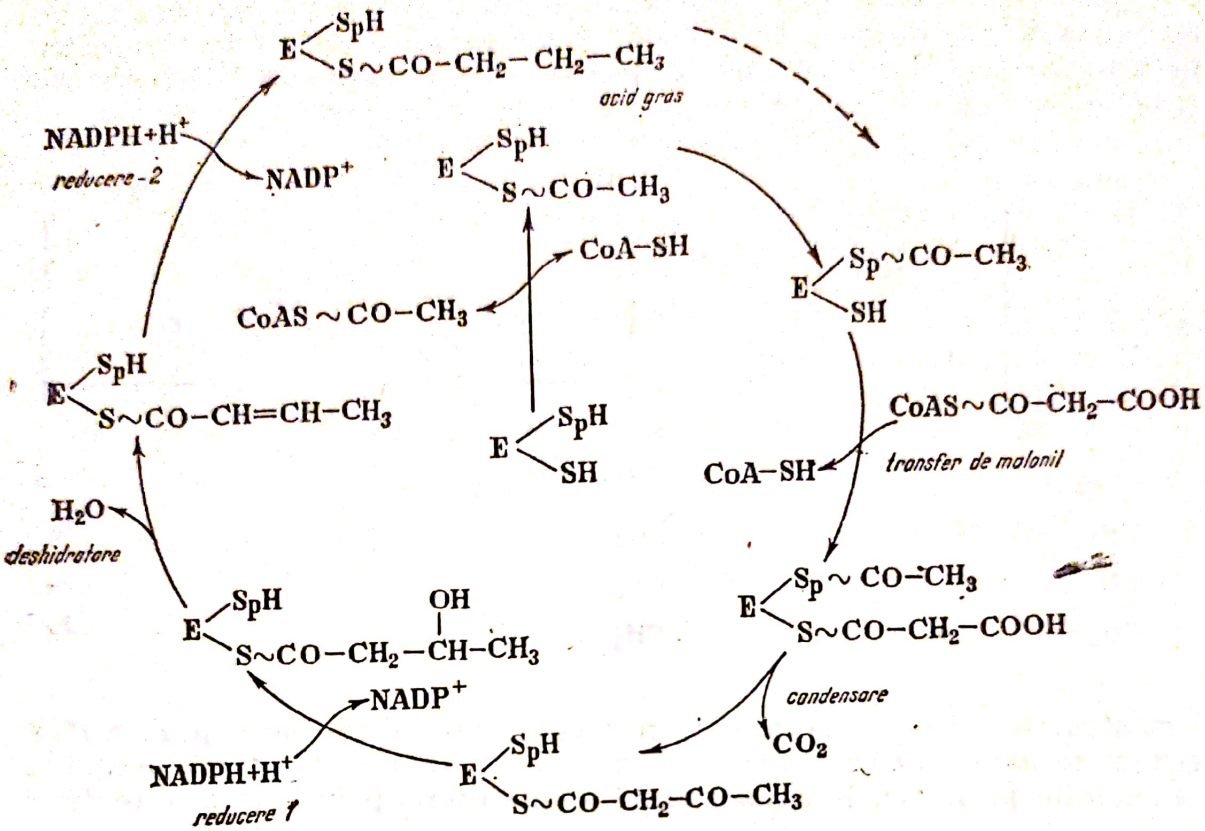


Fig. 54. Sinteza acizilor graşi plecînd de la acetatul activ.

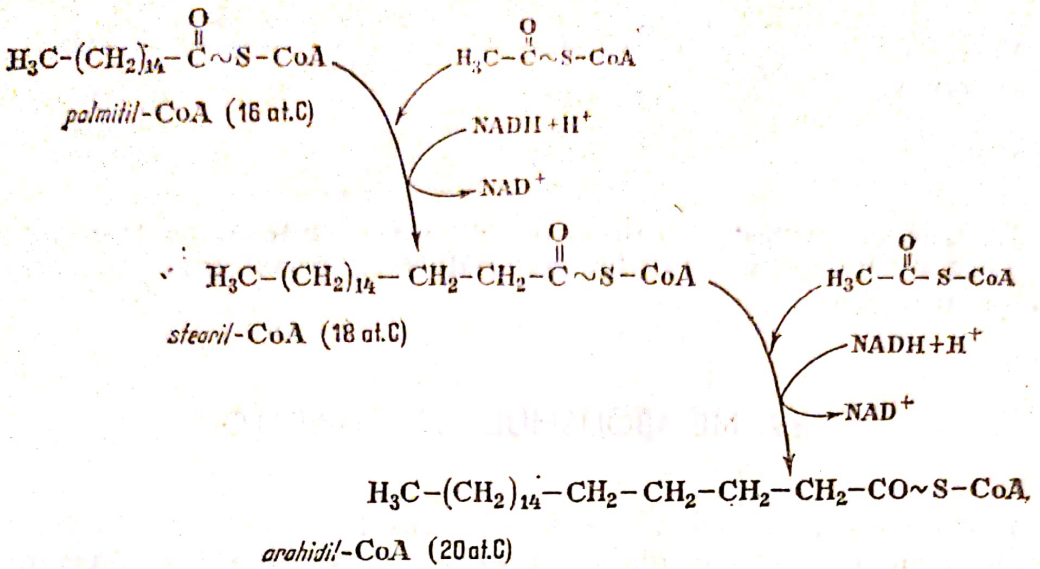
A treia sursă o reprezintă *izocitratdehidrogenaza* extramitocondrială, enzimă $NADP^+$-dependentă, stimulată de ATP şi care transformă acidul izocitric în acid α-cetoglutaric şi CO_2.

Viteza sintezei acizilor graşi este determinată de viteza sintezei trigliceridelor şi a fosfolipidelor, deoarece în mod normal în celule nu se acumulează acizi graşi liberi, precum şi de starea generală a organismului, regimul alimentar, aportul de vitamine, în special cele din complexul B şi a unor factori neuroendocrini.

8.1.2.3. *Alungirea lanţului atomilor de carbon* are loc în mitocondrii, parcurgîndu-se în ordine inversă reacţiile β-oxidării, adică se adaugă treptat cîte doi C de la acetil-CoA cu formare de acizi graşi cu 14, 16, 18, 20, 22 şi 24 atomi de carbon. Procesul necesită prezenţa ATP, NADH sau NADPH, iar sistemele enzimatice sînt cele care participă în procesul de β-oxidare, cu excepţia etapei de reducere a acil-CoA α-β nesaturat care se efectuează în prezenţa unei dehidrogenaze NAD^+—sau $NADP^+$—dependente. Enzima care condensează acil-CoA cu acetil-CoA are drept coenzimă piridoxal-5′-fosfatul.

Procesul de alungire poate avea loc şi la nivelul microzomilor, producîndu-se în prezenţa malonil-CoA ca donator de grupări acetil şi a NADPH ca agent de reducere.

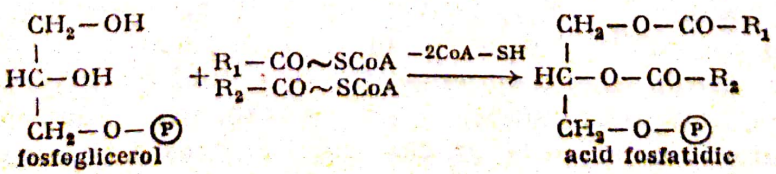
Scanned with OKEN Scanner

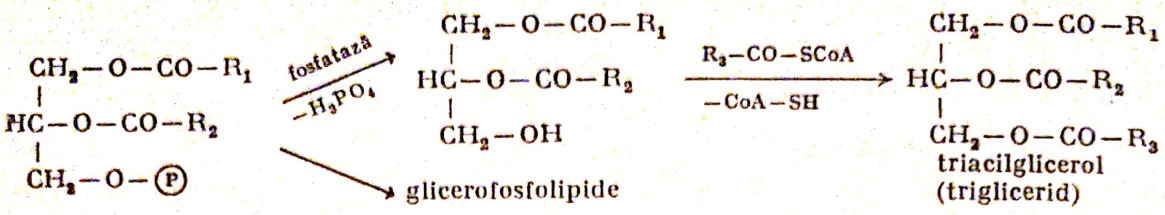


8.1.2.4. *Formarea acizilor graşi nesaturaţi* are loc — în cazul acidului oleic din acid stearic — sub acţiunea citocromului *P*-450, deci se petrece în microzomi, şi implică etape de oxidare, reducere şi de deshidratare. Iniţial se produce o oxidare în prezenţa oxigenului atomic, formîndu-se un cetoacid care ulterior se va reduce la un hidroxiacid. Procesul nu este încă pe deplin cunoscut. De subliniat faptul că o serie de acizi graşi liberi nesaturaţi, de o mare importanţă biologică, nu pot fi sintetizaţi în organismul animal decît într-o cantitate insuficientă, ceea ce necesită introducerea lor exogenă, prin alimente. Aceşti acizi graşi liberi nesaturaţi sînt denumiţi esenţiali şi sînt acizii linoleic, linolenic şi arahidonic.

În concluzie, sinteza acizilor graşi şi în continuare a trigliceridelor reprezintă o modalitate de înmagazinare a excesului de glucoză sub formă de acizi graşi. Această formă de depozit este deosebit de rentabilă pentru organism, deoarece, cu toate că 4,5 moli de glucoză generează un singur mol de acid palmitic, degradarea acestuia va pune în libertate o energie echivalentă cu cea obţinută prin oxidarea celor 4,5 moli de glucoză.

8.1.2.5. *Biosinteza trigliceridelor* are loc mai ales în ţesutul adipos şi în ficat, dar şi în alte organe, cu intensitate mult redusă. Prin acilarea, sub acţiunea acil-CoA-transferazei, a glicerol-3-fosfatului (format din reducerea dihidroxiacetonfosfatului sau a gliceraldehid-3-fosfatului, precum şi prin fosforilarea glicerolului sub acţiunea glicerokinazei), se formează trigliceridele. Iniţial se obţine acidul fosfatidic respectiv care, însă, fiind un intermediar metabolic atît în sinteza trigliceridelor, cît şi a fosfolipidelor este transformat practic simultan cu formarea sa, avînd o concentraţie tisulară sau sangvină deosebit de scăzută :





În ceea ce privește localizarea celulară a sintezei de trigliceride, a fost pusă în evidență o sinteză mai redusă în citoplasmă — și una mai intensă în microzomi.

8.2. METABOLISMUL FOSFOLIPIDELOR

Fosfolipidele, ca elemente indispensabile structurilor subcelulare, mai ales a membranelor celulare, reprezintă o clasă de substanțe complexe, de maximă importanță, dar greu de cercetat datorită faptului că sînt strîns integrate în arhitecturi polimoleculare. Participarea lor în structurile celulare este consecința unor proprietăți care le fac apte pentru aceste funcții, deoarece conțin în aceeași structură atît grupări hidrofile, cît și grupări hidrofobe, pentru a nu cita decît o singură caracteristică specifică.

Fosfolipidele se clasifică în funcție de constituentul polialcoolic prezent în structura lor, și anume glicerolul și sfingozina, deci fosfoglicerolipide (glicerolipide) și fosfosfingolipide (sfingolipide). Sinteza și degradarea lor, deci metabolismul, deși este deosebit de intens studiat, nu a fost precizat în toate amănuntele, fiind dependent de starea fiziologică din momentul dat a organismului respectiv. Ca element distinctiv se menționează faptul că sînt substanțe mai stabile din punct de vedere metabolic decît lipidele simple și în general decît majoritatea componentelor celulare; de asemenea, fapt care trebuie notat, fosfolipidele pot fi sintetizate prin reutilizarea unor componente din structura lor, ca de exemplu glicerolul, colina, colamina etc. și în același timp există sisteme care pot produce interconversiuni între diferiți reprezentanți. Aceste însușiri sînt legate evident de necesitatea unei judicioase reglări a raporturilor cantitative și calitative ale fosfolipidelor, substanțe de o importanță funcțională și structurală remarcabilă.

8.2.1. METABOLISMUL FOSFOGLICEROLIPIDELOR

Acest metabolism se desfășoară cu o viteză dependentă de metabolismul de ansamblu al celulelor în structura cărora intră fosfoglicerolipidele. De aici decurge economicitatea deosebită a proceselor catabolice și anabolice, interconversiunea între reprezentanți eliminînd pierderile inerente căilor metabolice lungi. Figura 55 ilustrează aceste caracteristici.

Scanned with OKEN Scanner

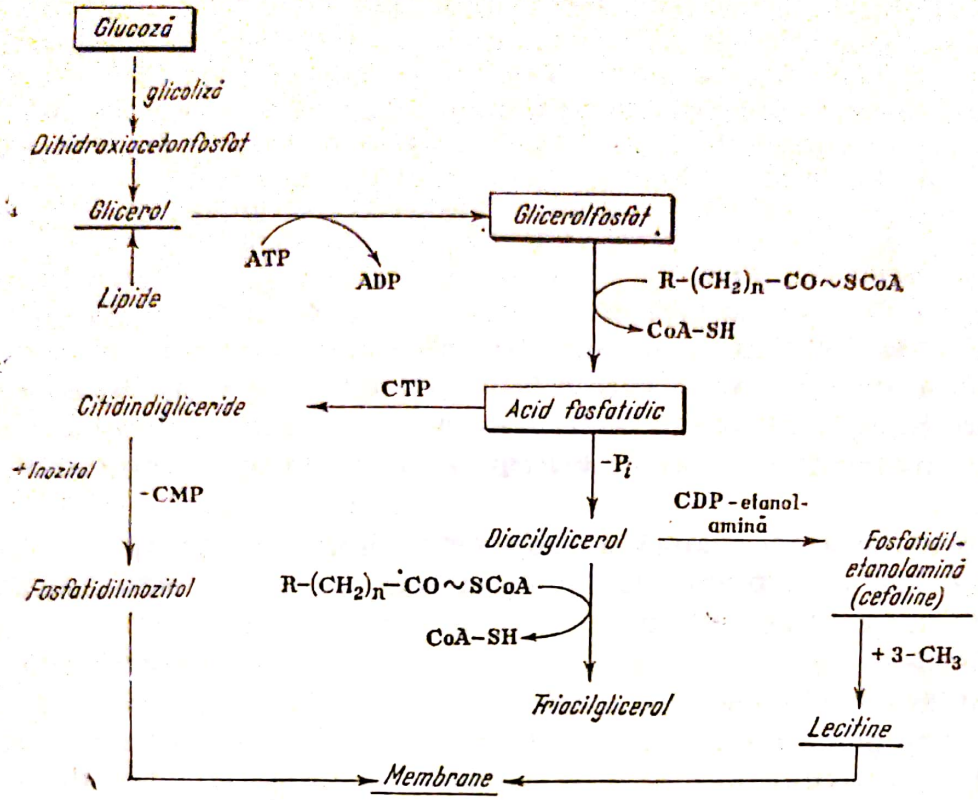


Fig. 55. Interconversia fosfolipidelor.

8.2.1.1. *Catabolismul fosfoglicerolipidelor* implică necesitatea desfacerii legăturilor esterice, ceea ce se realizează în organism sub acţiunea, atent controlată de o serie de factori de reglare, a mai multor sisteme enzimatice numite generic *fosfolipaze*. Fosfolipazele desfac în mod selectiv legăturile esterice, şi anume: fosfolipaza A_1 desface acidul gras saturat din poziţia α a glicerolului, fosfolipaza A_2 pe acela nesaturat din poziţia β, fosfolipaza *B* desface restul acil al lizofosfogliceridelor cu formare de glicerol-3-fosfat şi, în sfîrşit, fosfolipaza *C* desface legătura fosfoesterică, determinînd formarea unui diglicerid şi eliberînd fosforilcolina, fosforiletanolamina etc. (v. capitolul „Lipide").

Localizarea acestor fosfolipaze este tisular— şi organ—specifică, repartizarea lor intracelulară fiind, de asemenea, diferită. Structura lor, substratul asupra căruia acţionează în mod preferenţial, activatorii şi inhibitorii, caracteristicile cinetice, diferă de la enzimă la enzimă. Fosfolipaza A_1 este localizată în microzomi, lizozomi şi membrana celulară a hepatocitului, precum şi în creier, pe cînd fosfolipaza A_2 se află în mitocondriile intestinului şi pancreasului; desfăşurarea activităţii lor nu are însă loc decît după înlăturarea din structură a unui polipeptid cu masă moleculară mică cu eliberarea centrilor activi. Activitatea acestor enzime este în acelaşi timp mult stimulată de prezenţa ionilor Ca^{2+}. Reglarea activităţii fosfolipazelor se realizează şi prin trecerea monomerului inactiv în dimer activ, echilibrul celor două forme fiind controlat prin intermediul AMP_c şi a *p*H-ului mediului care condiţionează şi viteză de reacţie. Limitele de *p*H între care diversele fosfolipaze au activitatea maximă sînt cuprinse între

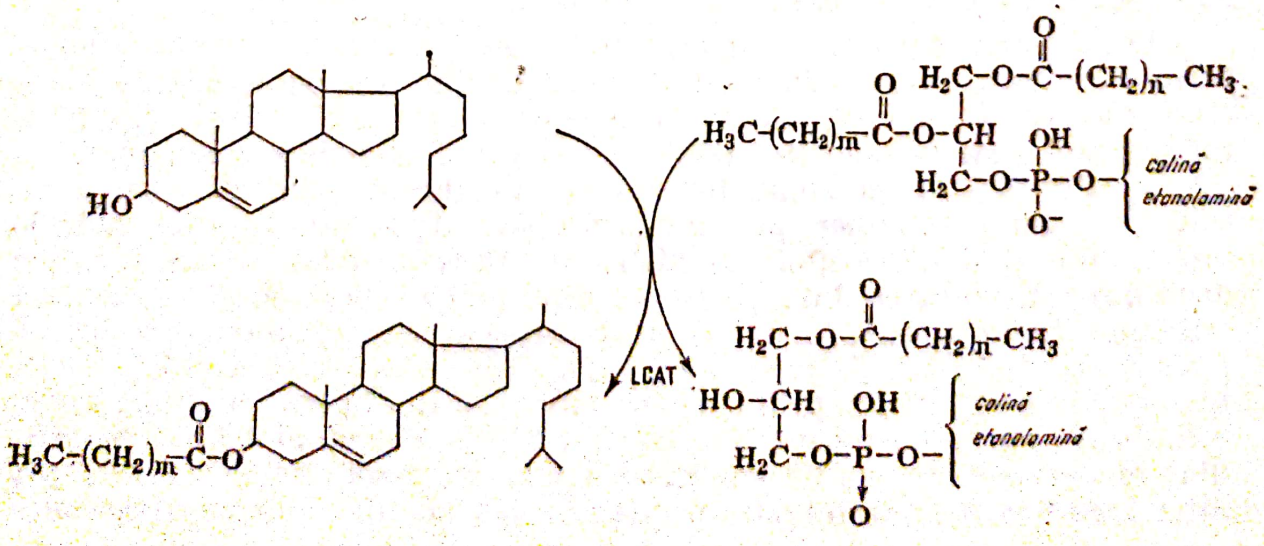
4 și 8. Substratele asupra cărora acționează sînt, în ordine: lecitină > > cefalină > fosfatidilserină > cardiolipide > plasmalogen. Fosfolipazele A_1 și A_2 se găsesc sub forma mai multor izoenzime — 6 pînă la 9 — cu caracteristici cinetice diferite. Au mase moleculare relativ mici și sînt termostabile, fiind active chiar și după ce au fost menținute la 70°C, datorită structurii lor bine stabilizată prin legături disulfurice.

Veninul șerpilor conține cantități mari de fosfolipază A_1 și A_2, enzime care mai fac parte și din bagajul enzimatic al multor bacterii patogene. Efectul toxic al veninurilor se datorează, pe de o parte lezării hematiilor, împiedicîndu-se astfel procesele oxidative, iar pe de alta, lezării tuturor membranelor celulare, modificîndu-li-se caracteristicile de permeabilitate în mod ireversibil, fapt care poate determina în mod rapid moartea. În doze mici, controlate, veninul șerpilor este astăzi utilizat în terapia clinică, intrînd în compoziția a numeroase medicamente cu efecte remarcabile.

Fosfolipaza *C*, enzimă ce acționează numai asupra glicerolipidelor, este localizată în microzomi și determină formarea fosforil derivaților respectivi, care pot fi ulterior reutilizați.

La nivelul microzomilor hepatici, acolo unde este dealtfel sediul catabolismului și anabolismului fosfolipidelor, există un sistem eficient de reacilare, care poate esterifica, practic simultan cu acțiunea fosfolipazelor A_1 sau A_2, hidroxilul primar sau secundar eliberat, modificîndu-se astfel natura glicerofosfolipidului respectiv. Aceste aciltransferaze sînt specifice fiecărui acid gras pe care îl transferă și au ca rol adaptarea extrem de rapidă a proprietăților membranei față de anumite necesități funcționale.

Hematiile conțin un sistem particular de acilare care necesită, pe lîngă lecitină și o cantitate mică de cefalină, și colesterol plasmatic. Acest sistem enzimatic, denumit *lecitincolesterolaciltransferază* (LCAT) realizează, simultan cu deacilarea în poziția β a lecitinelor sau cefalinelor și o esterificare a colesterolului liber. Lizolecitinele formate sînt imediat reacilate. Acest sistem enzimatic mai este întîlnit și la nivelul intestinului și ficatului.

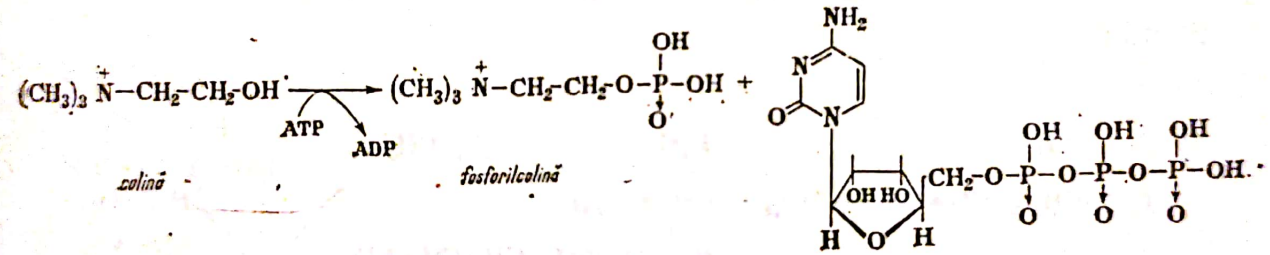


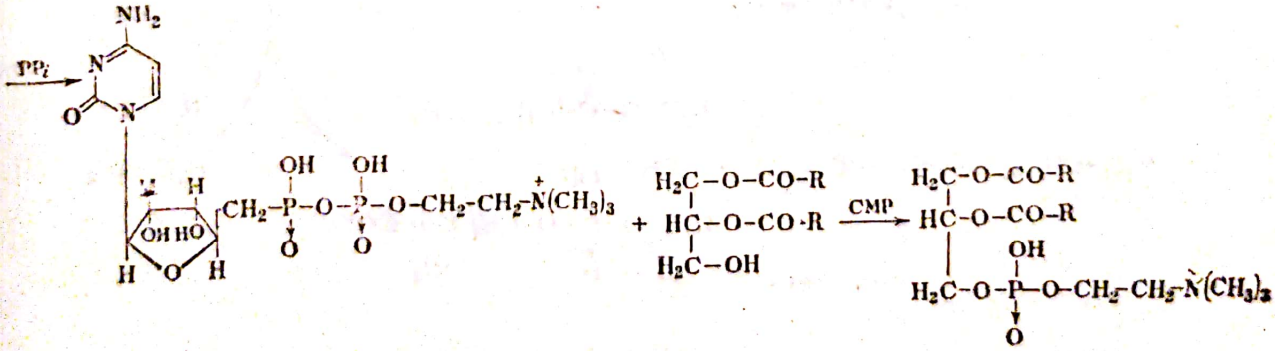
Deficienţe în activitatea acestei enzime produc grave tulburări metabolice.

8.2.1.2. *Sinteza glicerofosfolipidelor* necesită acizi fosfatidici; aceştia se pot obţine pe mai multe căi, respectiv prin acilarea glicerol-3-fosfatului sau a dihidroxiacetonfosfatului, precum şi din mono- şi digliceride.

Diferiţii reprezentanţi ai glicerofosfolipidelor se sintetizează, în majoritatea cazurilor, după o schemă comună; la aceste sinteze participă ca donator de energie CTP şi nu ATP, iar sediul sintezei îl constituie microzomii. De aici decurge şi uşurinţa proceselor de interconversiune care au loc între diferitele tipuri de fosfolipide, scopul final fiind acela al unei repartizări calitative şi cantitative conforme cu necesităţile celulelor respective, realizîndu-se maximum de economie din punct de vedere energetic. De reamintit că repartizarea celulară a glicerofosfolipidelor variază mult de la un organ la altul.

Sinteza fosfatidilcolinei (lecitină) se desfăşoară prin unirea unui diglicerid cu fosforilcolina, iar digliceridul se formează prin acţiunea unei fosfataze asupra acizilor fosfatidici. Fosforilcolina se obţine prin fosforilarea colinei în prezenţa ATP. Condensarea celor două componente este mijlocită de un intermediar metabolic, şi anume CDP-colina, care se obţine din CTP şi fosforilcolină. Procesele sînt prezentate mai jos.

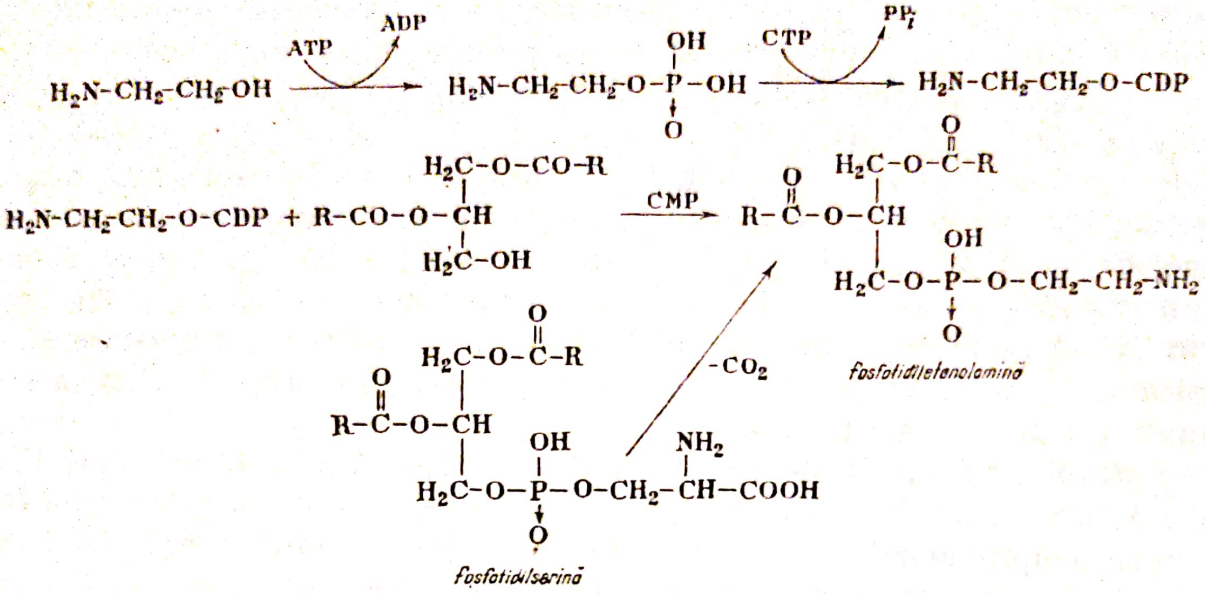




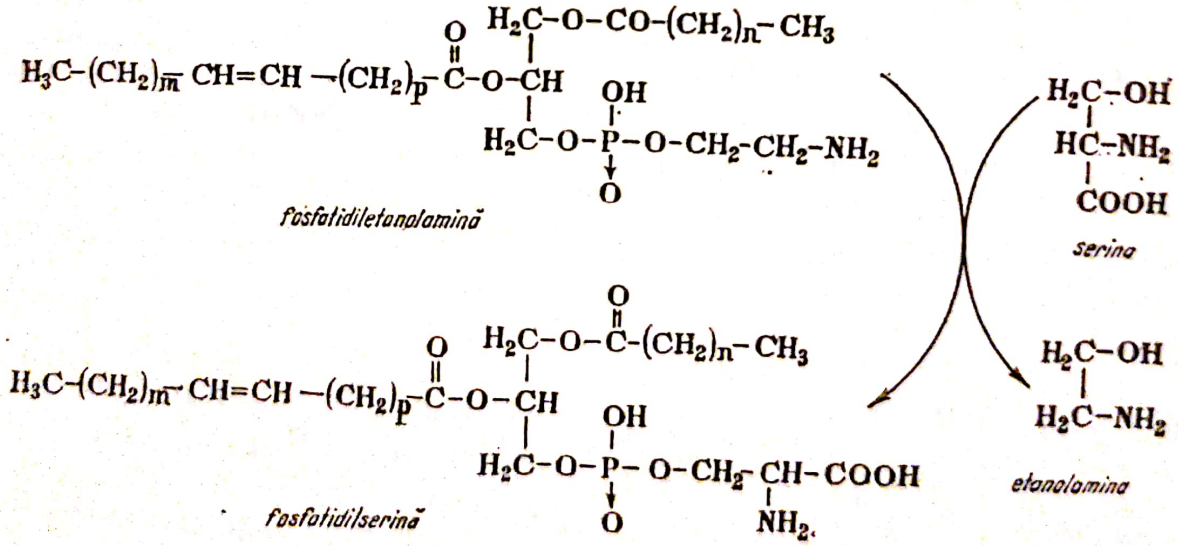
Fosfatidilcolina, care este cel mai răspîndit glicerolipid, se mai poate forma şi prin metilarea etanolaminei din structura fosfatidiletanolaminei, donatorul de grupări metil fiind S-adenozilmetionina.

Sinteza fosfatidiletanolaminei (cefalina) are loc în mod similar, şi anume prin condensarea digliceridelor cu CDP-etanolamina, conform

schemei de mai jos ; de remarcat faptul că sinteza sa poate avea loc și prin decarboxilarea serinei din structura fosfatidilserinei :

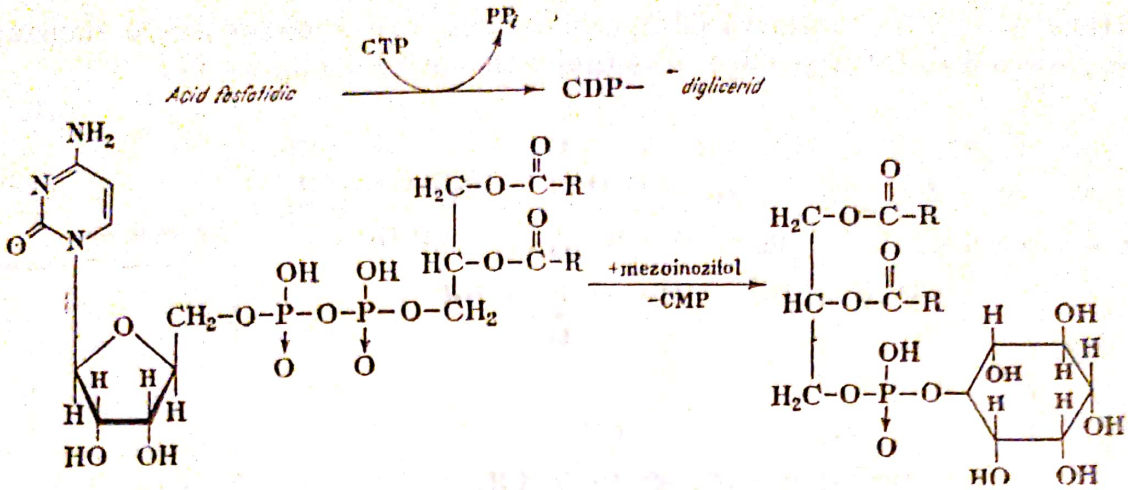


Fosfatidilserina se obține printr-o reacție de dublu schimb care are loc între etalonamina din structura fosfatidiletanolaminei și serina liberă :

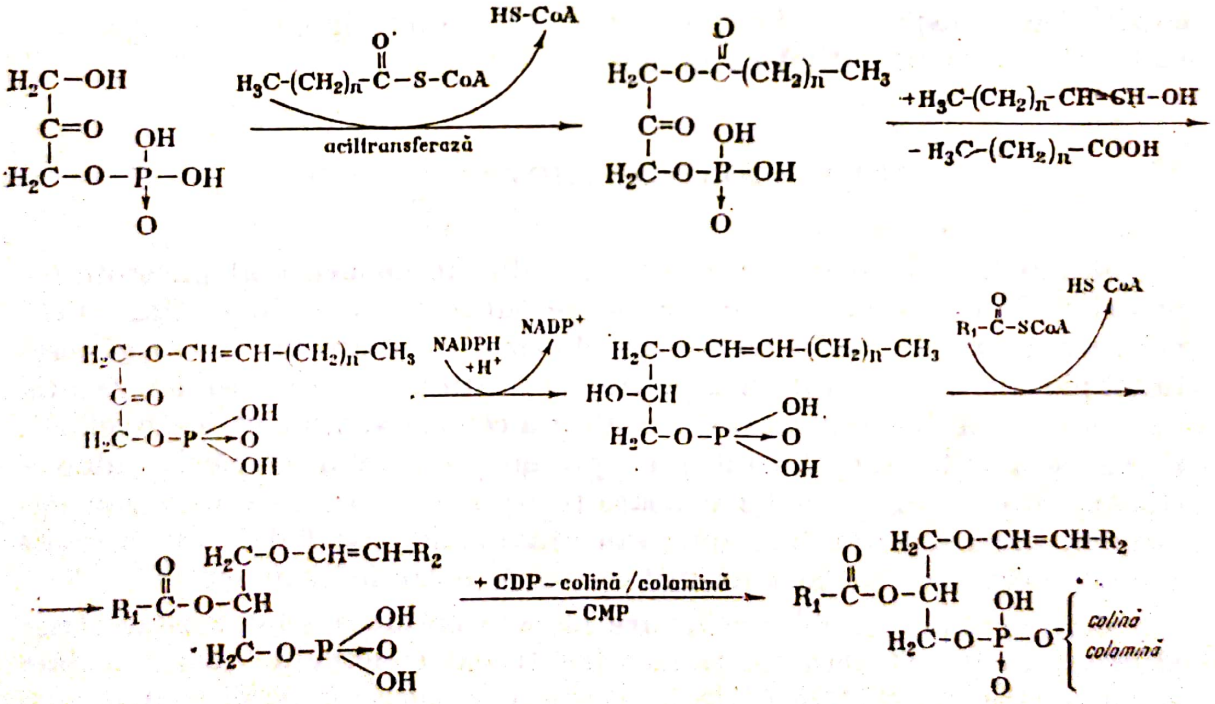


Puțin diferită față de modalitățile de sinteză prezentate mai sus este sinteza fosfatidilinozitolului, care nu începe prin formarea inițială a CDP-inozitolului, ci prin formarea CDP-gliceridului respectiv, care se va condensa ulterior cu inozitolul. Fosforilarea fosfatidilinozitolului se face prin acțiunea ATP, sediul sintezei fiind tot la nivelul microzomilor :

Scanned with OKEN Scanner



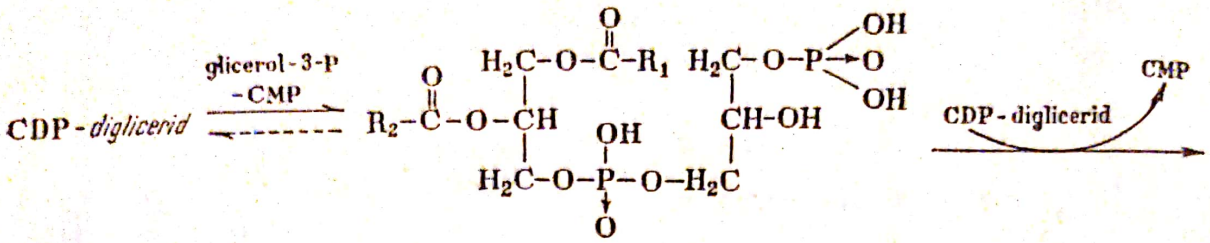
Sinteza plasmalogenilor, componente localizate mai ales în inimă şi lichidul seminal, mai puţin în sistemul nervos şi sînge, se desfăşoară printr-o reacţie de schimb în poziţia α între dihidroxiacetonfosfatul acilat şi un alcool nesaturat cu număr mare de atomi de carbon (C_{16}, C_{18} şi C_{20}), care este redus ulterior sub acţiunea unei enzime NADPH-dependente, după care urmează un alt proces de acilare şi o condensare cu CDP-colina sau CDP-etanolamina:

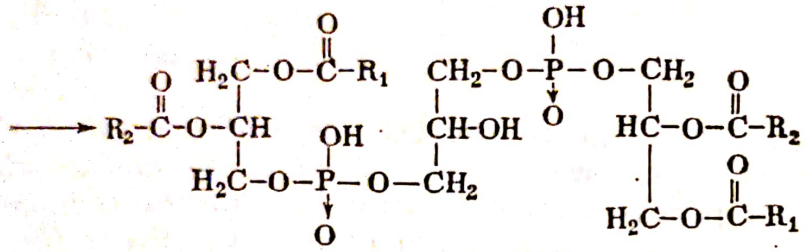


Enzimele care catalizează aceste reacţii sînt localizate în microzomi, iar alcoolul respectiv se formează din aldehide saturate sau nesaturate, cu un număr mare de atomi de carbon.

Fosfatidilglicerolfosfoglicerolul din cardiolipide se sintetizează în mitocondri, mai cu seamă în cele din inimă. Prin reacţia dintre acizii fos-

fatidici şi CTP se formează CDP-digliceridul care se condensează succesiv cu glicero-3-fosfatul şi cu o altă moleculă de CDP-diglicerid:





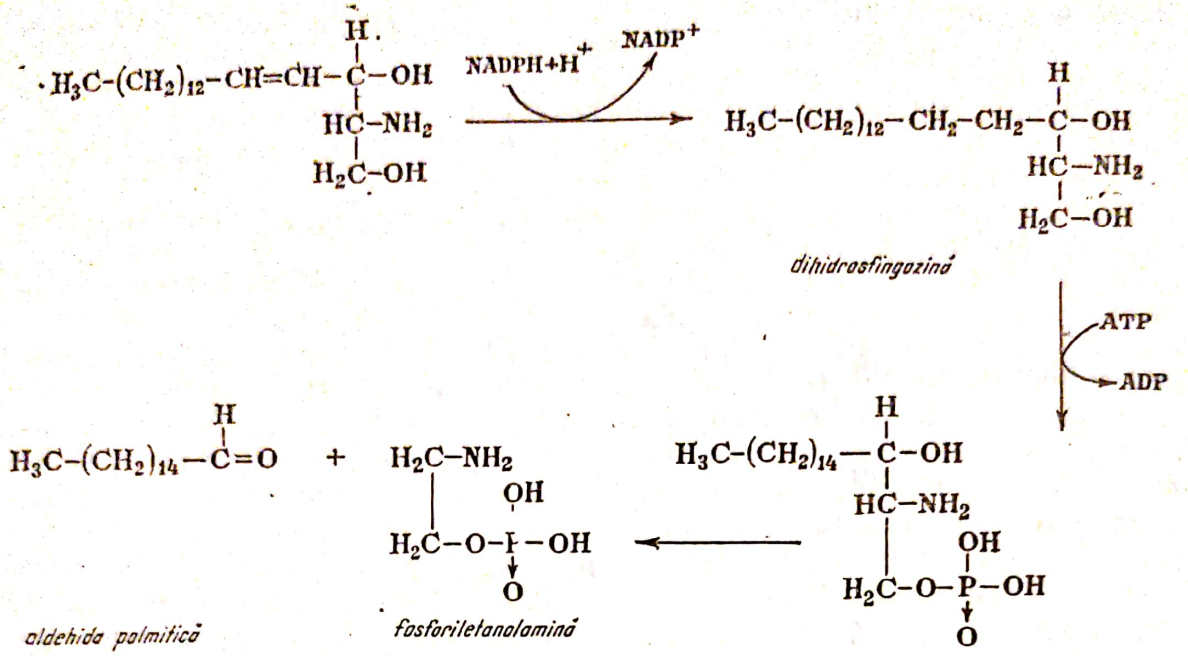
cardiolipide

Sintezele glicerofosfolipidelor, care, aşa cum s-a mai menţionat, au loc în majoritatea cazurilor în microzomi şi doar foarte puţine în mitocondri, se desfăşoară în ficat, de unde, sub forma lipoproteinelor serice, sînt vehiculate pretutindeni în organism.

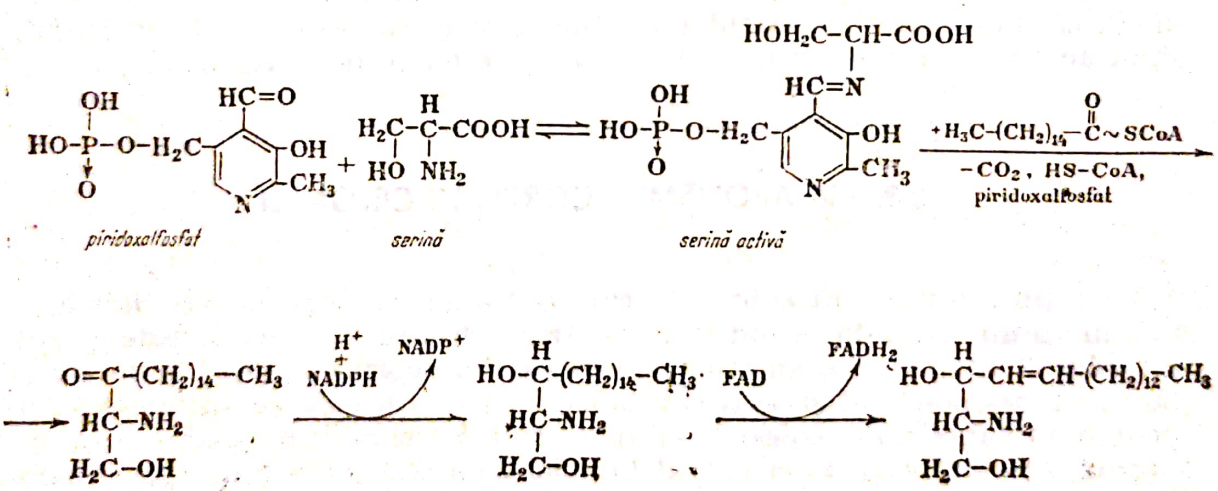
8.2.2. METABOLISMUL FOSFOSFINGOLIPIDELOR

Metabolismul acestor compuşi este diferit de acela al glicerofosfolipidelor. Din categoria acestei clase de substanţe fac parte sfingomielinele, cerebrozidele, sulfatidele şi gangliozizii. Cu toate că sinteza glicerofosfolipidelor are loc tot în microzomii ficatului, localizarea lor se află cu precădere în sistemul nervos (substanţa cenuşie şi albă, creier, mielină), rinichi şi alte organe. Acidul gras, prezent la nivelul grupării amino a sfingozinei este legat amidic şi poate fi saturat (stearic, palmitic sau lignoceric) sau nesaturat (nervonic sau arahidonic), iar hidroxidul alcoolic primar poate fi esterificat de fosforilcolină, colamină sau serină.

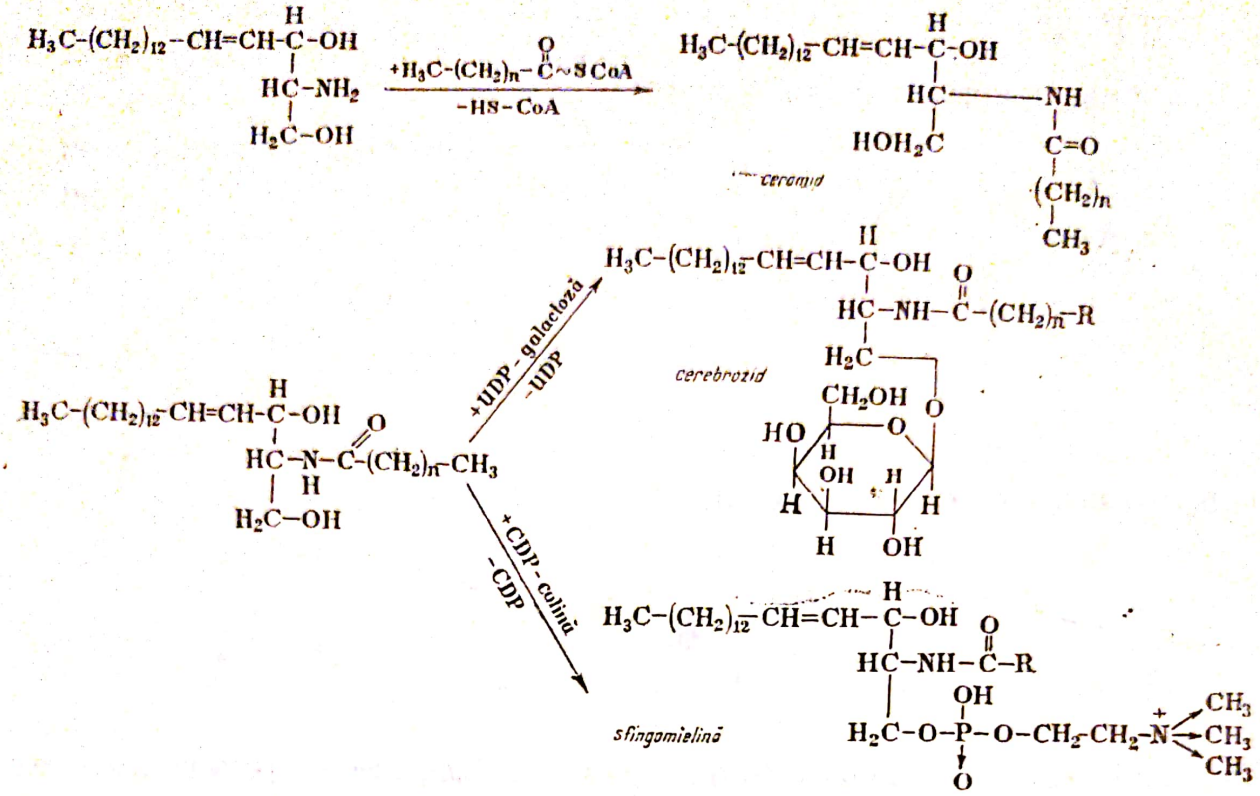
Catabolismul sfingolipidelor are loc sub acţiunea unor enzime strict specifice a căror structură este încă insuficient cunoscută. Aceste enzime sînt capabile să scindeze toate legăturile care unesc diverşii componenţi cu sfingozina, putînd elibera astfel fosforilcolina, etanolamina, serina, galactoza, acidul sulfurie, acizii graşi saturaţi sau nesaturaţi. Sfingozina din sfingolipide este iniţial redusă la dihidrosfingozină; urmează o fosforilare şi apoi o scindare în fosforiletanolamină şi aldehida palmitică:



Sinteza componentei de bază, a sfingozinei, are loc prin condensarea aminoacidului serină cu plamitil-CoA. Enzimele care catalizează acest proces au drept coenzime piridoxalfosfatul (vitamina B_6), NADP+ și FAD. Reacția decurge conform ecuațiilor de mai jos:



Etapa următoare constă în acilarea sfingozinei cu unul din acizii grași saturați sau nesaturați amintiți mai înainte; apoi se face esterificarea grupării alcoolice primare cu fosforil derivații enumerați sau cu galactoza. În acest ultim caz, condensarea are loc prin intermediul UDP-galactozei. Se formează o substanță denumită *psihozină*, compus care fie că se acilează cu formare de cerebrozid, fie că este utilizat în sinteza gangliozizilor:



Gangliozizii sînt componente complexe incomplet cunoscute pînă astăzi care conțin, printre altele, cerebrozizi și acizi sialici. În ultimii ani li s-a acordat o atenție sporită după ce s-a constatat că structura lor se modifică substanțial în cazul unor boli grave, ca de exemplu cancerul. Pînă acum au fost identificate zece tipuri diferite de gangliozizi.

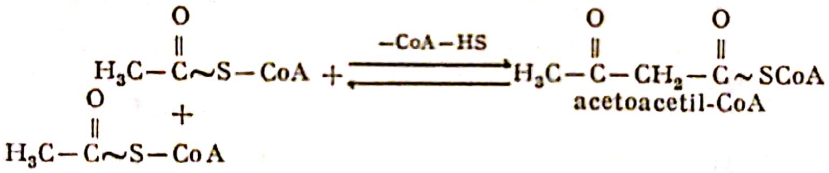
8.3. METABOLISMUL CORPILOR CETONICI

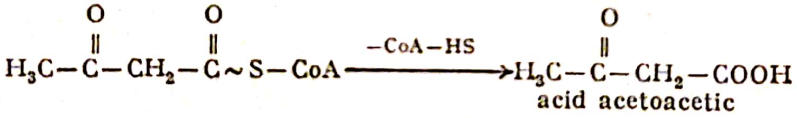
Corpii cetonici sînt substanțe care se formează cu precădere în cursul metabolismului lipidic, fiind însă în strînsă legătură și cu metabolismul glucidic. Pentru înțelegerea rolului pe care îl au corpii cetonici se va trata mai întîi anabolismul și apoi catabolismul lor, așa cum se va proceda și pentru metabolismul colesterolului. Corpii cetonici sînt β-ceto- sau β-hidroxiacizi derivați de la acidul butiric, compuși solubili în apă și care iau naștere din acetil-CoA. Dintre aceștia, acidul acetoacetic și β-hidroxibutiric reprezintă o importantă sursă de energie; pe de altă parte, unele aspecte ale metabolismului corpilor cetonici au importante implicații medicale.

Sinteza corpilor cetonici are loc în exclusivitate în mitocondriile ficatului și depinde de o serie de factori hormonali, metabolici și de natură alimentară. Este astăzi binecunoscut faptul că după 2—3 zile de post sau în cazul unei alimentații insuficiente, concentrația lor în sînge crește deosebit de mult. În primele zile de post nivelul glucozei și insulinei serice scad într-un grad limitat, acizii grași liberi prezintă o creștere progresivă,

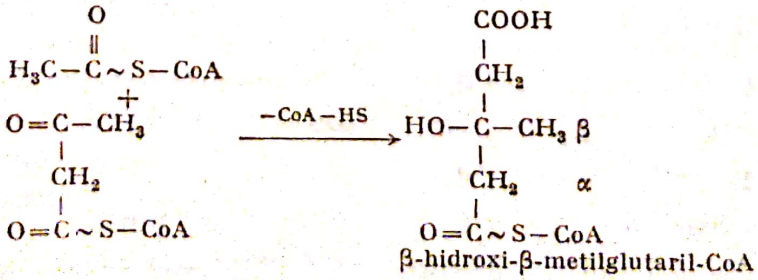
în timp ce corpii cetonici cresc spectaculos. S-a constatat la persoane obeze că într-o inaniție prelungită timp de cîteva săptămîni, ficatul poate produce aproximativ 35 g acid acetoacetic și 75 g acid β-hidroxibutiric pe zi. Aceasta dovedește că, în stare de inaniție, glucoza, și într-o mare măsură chiar acizii grași liberi, sînt substituiți cu corpii cetonici în calitate de compuși pe seama cărora se obține energie. Dacă sinteza corpilor cetonici are loc exclusiv în mitocondriile ficatului, oxidarea, deci catabolizarea lor, nu mai are loc aici decît într-o proporție minimă, fiind în schimb intensă în mușchii scheletici, inimă, rinichi, plămîn, creier.

Sinteza corpilor cetonici în mitocondri este corelată direct cu β-oxidarea acizilor grași care sînt eliberați prin lipoliză din țesutul adipos. Așa cum s-a mai menționat, substanța de la care se sintetizează corpii cetonici este acetil-CoA, care, în exces fiind, se poate condensa în două moduri formînd acetoacetil-CoA. În primul caz se condensează două molecule de acetil-CoA eliberîndu-se o moleculă de CoA. Coenzima A din structura acetoacetil-CoA se poate desface sub acțiunea unei enzime denumite *acetoacetil-CoA-deacilază* rezultînd acidul respectiv, care fiind solubil este preluat în sînge și transportat astfel pînă la organele unde va fi metabolizat; aici, acidul acetoacetic este transformat în două molecule de acetil-CoA, compus care este oxidat în mitocondri pînă la CO_2 și H_2O.

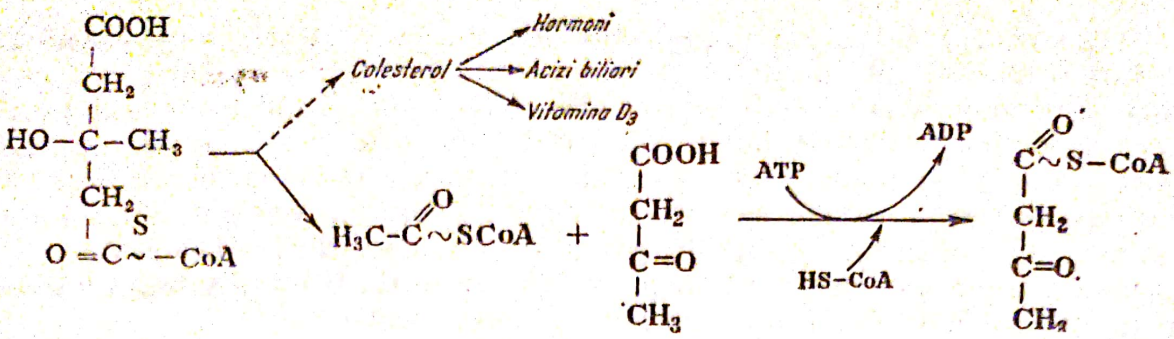




Cea de-a doua cale, care este și cea mai importantă, constă în condensarea a trei molecule de acetil-CoA, formîndu-se un intermediar de mare importanță denumit β-hidroxi-β-metilglutaril-CoA. Într-o primă etapă se formează tot acetoacetil-CoA care se condensează cu o a treia moleculă de acetil-CoA, obținîndu-se intermediarul amintit:

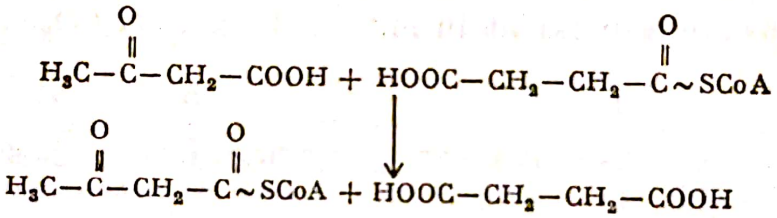


De subliniat că β-hidroxi-β-metilglutaril-CoA este intermediar și în sinteza colesterolului, existînd deci o strînsă relație între acești compuși



Corpii cetonici sintetizaţi pe cele două căi în ficat nu pot fi metabolizaţi de către acesta decît într-o proporţie limitată, deoarece ficatul nu posedă enzima capabilă să desfacă şi să reactiveze acidul acetoacetic; enzima respectivă este denumită *acetoacetiltiokinază* şi necesită ATP pentru reacţia pe care o catalizează.

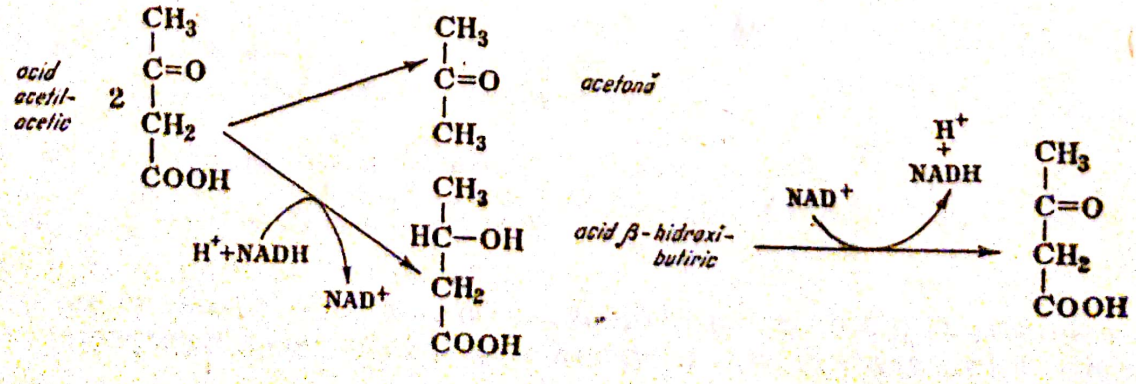
O altă cale de formare a acetoacetil-CoA din acidul acetoacetic reactivat cu CoA este corelată cu formarea acidului succinic din succinil-CoA; acest proces de interconversiune are loc în mitocondri, cu excepţia celor hepatice, cărora le lipseşte şi acest sistem enzimatic:



În muşchii scheletici, inimă, rinichi, plămîn, creier etc. acetoacetil-CoA este desfăcut, sub acţiunea tiolazei, în două molecule de acetil-CoA, fiind metabolizat prin intermediul ciclului Krebs şi generînd deci 12 moli de ATP.

Din acidul acetoacetic se formează şi ceilalţi doi corpi cetonici, şi anume acetona, care ia naştere prin decarboxilare, şi acidul β-hidroxibutiric prin reducere sub acţiunea unei enzime NAD^+-dependente. Acidul β-hidroxibutiric este oxidat pînă la CO_2 şi H_2O cu obţinere de energie, în timp ce acetona, fiind o substanţă volatilă, se elimină prin plămîni; de aceea respiraţia bolnavilor de diabet, boală în care corpii cetonici cresc mult în sînge, se caracterizează prin mirosul de acetonă.

Oxidarea acidului β-hidroxibutiric are loc numai după ce acesta a fost activat prin formare de tioesteri-CoA şi dehidrogenat, deci transformat în acetoacetil-CoA:

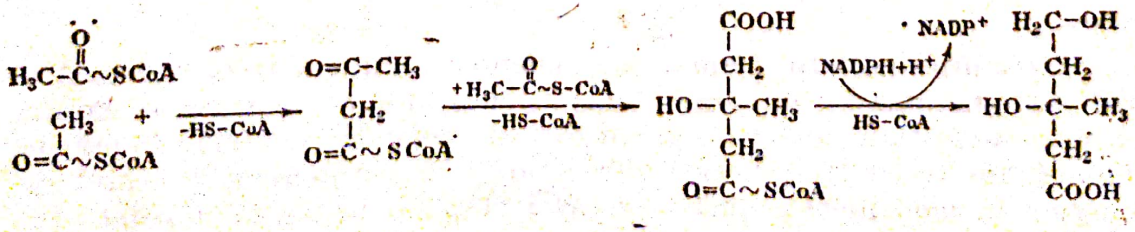


Formarea şi, implicit, catabolizarea corpilor cetonici depinde de metabolismul glucidic şi al acizilor graşi liberi. Corpii cetonici reprezintă o sursă energetică de care se uzează în cazul unor eforturi fizice prelungite, în inaniţii sau hrană insuficientă pentru a se suplini glucoza, care, în aceste condiţii, este oxidată numai de către organele strict dependente de glucoză cum sînt creierul, hematiile etc. În cazuri patologice, mai ales în diabet, concomitent cu diminuarea catabolismului glucidic se produce o încetinire a sintezei acizilor graşi liberi datorită lipsei $NADPH + H^+$, care se formează pe calea pentozofosfaţilor. În consecinţă, va creşte concentraţia acetil-CoA în mitocondri şi metabolismul se va îndrepta spre sinteza corpilor cetonici şi a colesterolului. Concentraţia corpilor cetonici în sînge va creşte simţitor, ceea ce va antrena eliminarea lor prin urină, deci cetonuria. Cum însă eliminarea corpilor cetonici prin urină se face sub forma unor săruri alcaline, în cazul unor cetonurii prelungite se ajunge la o epuizare a rezervelor alcaline şi în consecinţă se instaurează o acidoză cu urmări grave.

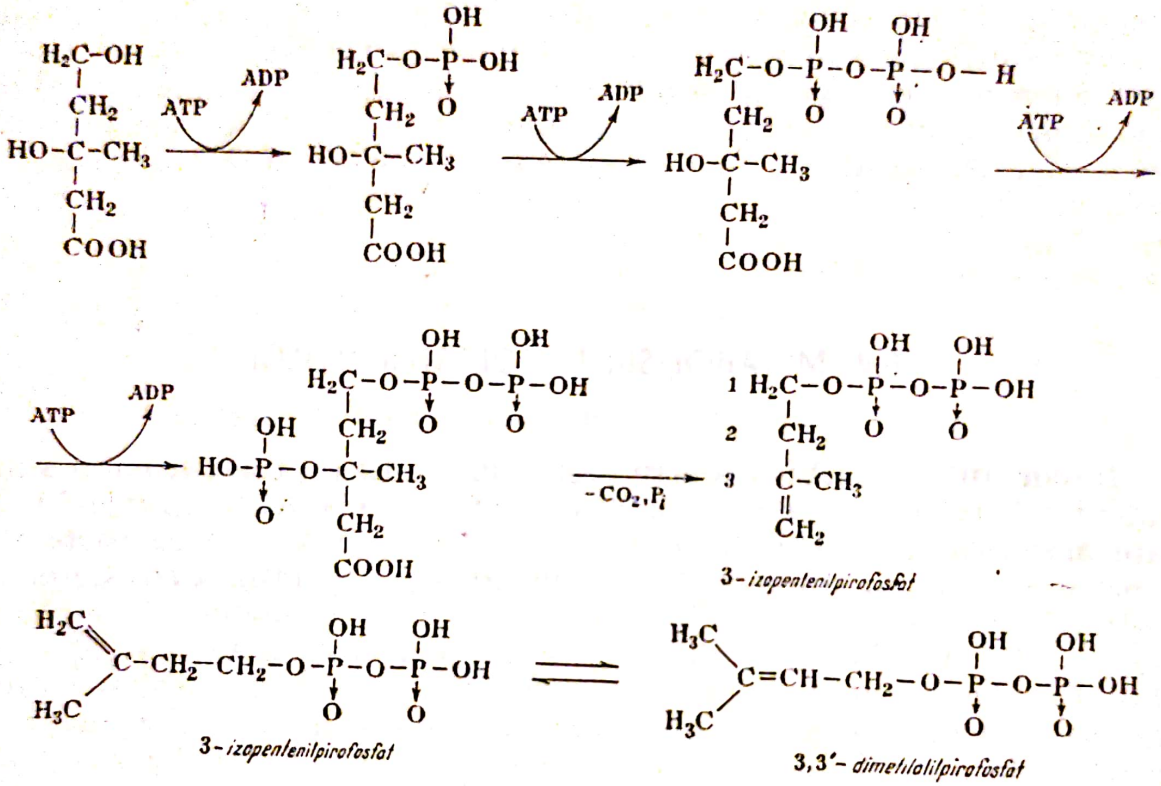
8.4. METABOLISMUL COLESTEROLULUI

Importanţa deosebită pentru organismul uman a colesterolului a fost evidenţiată cu ocazia descrierii structurii acestuia (cap. „Lipide"). În mare majoritate, colesterolul are o origine endogenă; o mică parte este de origine exogenă, alimentară. Concentraţia în organism a colesterolului creşte odată cu vîrsta, legat de modificările care se produc în metabolismul glucidic şi lipidic general, de care este dependentă sinteza colesterolului. Deci, cu timpul se produce o acumulare cronică a colesterolului, mai ales în pereţii arterelor; procesul este lent, dar ireversibil, ritmul fiind diferit de la un individ la altul. Se ajunge astfel la ateroscleroza vaselor de sînge şi în consecinţă la o irigare sanguină din ce în ce mai defectuoasă. Pe de altă parte, formarea plăcilor ateromatoase bogate în colesterol constituie una din principalele cauze ale accidentelor cardiovasculare.

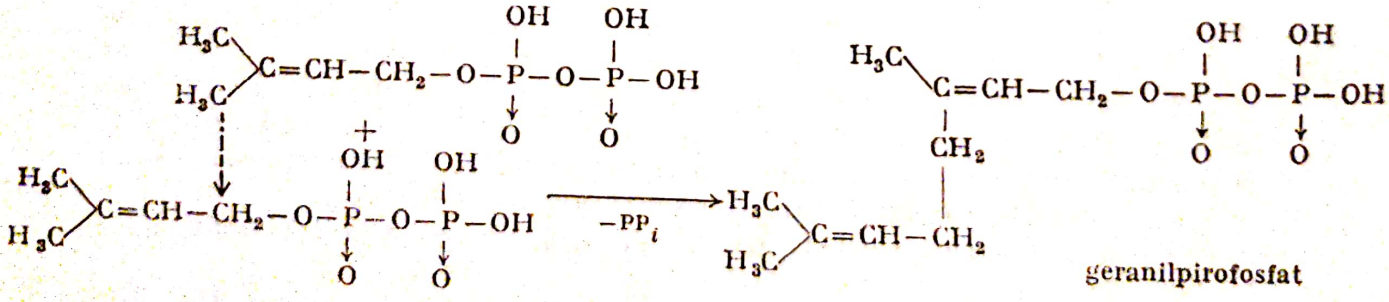
Sinteza colesterolului se desfăşoară în diferite organe cum ar fi (în ordinea intensităţii procesului): ficat, cortex suprarenal, intestin, piele, aortă, testicul, iar sediul intracelular îl reprezintă microzomii. Sinteza începe prin condensarea a două şi apoi a trei molecule de acetil-CoA formîndu-se acetoacetil-CoA şi apoi β-hidroxi-β-metilglutaril-CoA, compus care este considerat drept intermediarul principal în această sinteză. Prin reducerea β-hidroxi-β-metilglutaril-CoA sub acţiunea unei enzime $NADP^+$-dependente se formează iniţial un hidroxiacid, denumit acid mevalonic:



Enzima care catalizează această reacție de reducere, *hidroximetil-glutaril-CoA-reductaza*, are rol de reglare ca urmare a structurii alosterice. Ea este inhibată printr-o reacție de tip *feedback* de către produsul final al procesului, și anume de către colesterol. Acidul mevalonic este în continuare fosforilat în prezența ATP, formîndu-se succesiv mevalonat-**5**-fosfatul și apoi acidul **5**-pirofosfomevalonic. După o nouă fosforilare a hidroxilului din poziția β, urmată de o decarboxilare, se obține **3**-izopentilpirofosfatul care, la rîndul său, poate fi izomerizat prin mutarea dublei legături la **3,3′**-dimetilalilpirofosfat :

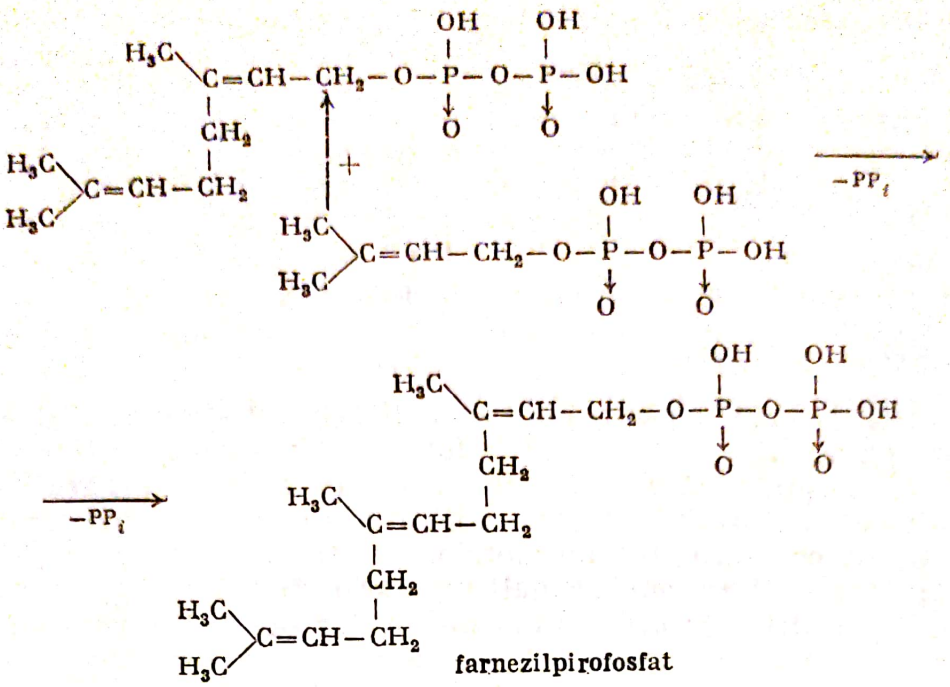


Condensarea a două molecule de **3,3′**-dimetilalilpirofosfat conduce la un compus cu 10 atomi de carbon, geranilpirofosfatul :



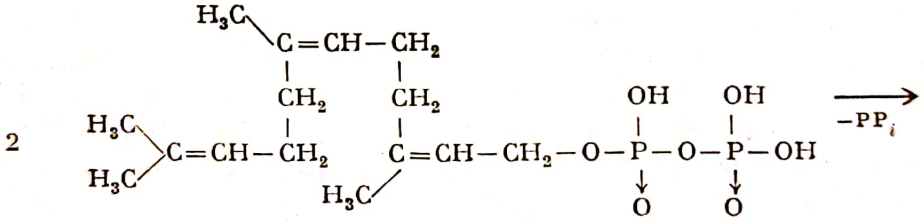
Geranilpirofosfatul format se condensează cu o a treia moleculă de **3,3′**-dimetilalilpirofosfat, formîndu-se o substanță cu 15 atomi de carbon, farnezilpirofosfatul, precursorul tuturor catenelor laterale ale vitaminelor liposolubile (vitaminele E și K), precum și a carotenilor, procesul decurgînd în mod identic pînă la această etapă și în regnul vegetal.

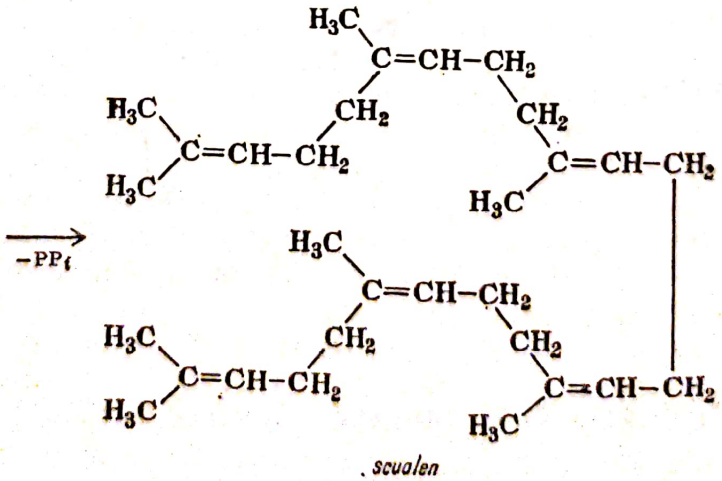
Scanned with OKEN Scanner



farnezilpirofosfat

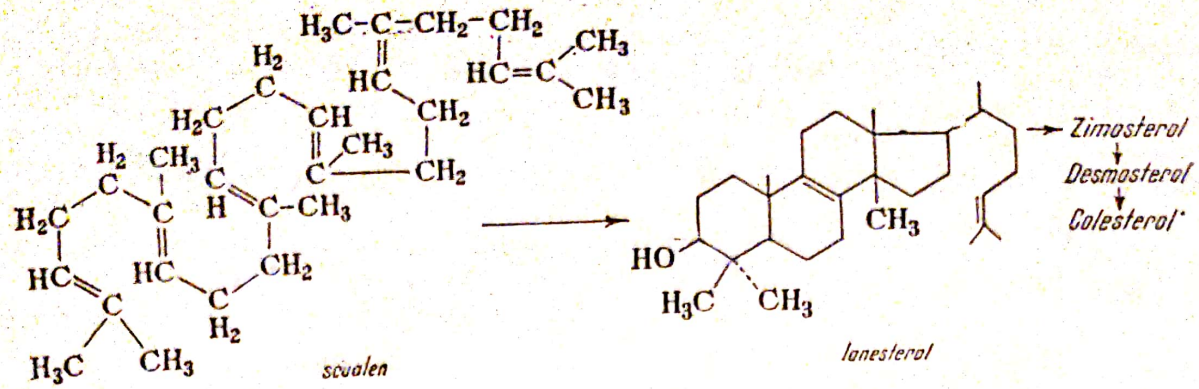
Prin unirea a două molecule de farnezilpirofosfat se formează o substanță cu 30 atomi de carbon, scualenul, care prin ciclizare ulterioară dă naștere primului derivat ciclic, și anume lanosterolului. Procesul, care are loc în microzomi, necesită reacții oxidative la care participă citocromul *P*-450 :





scualen

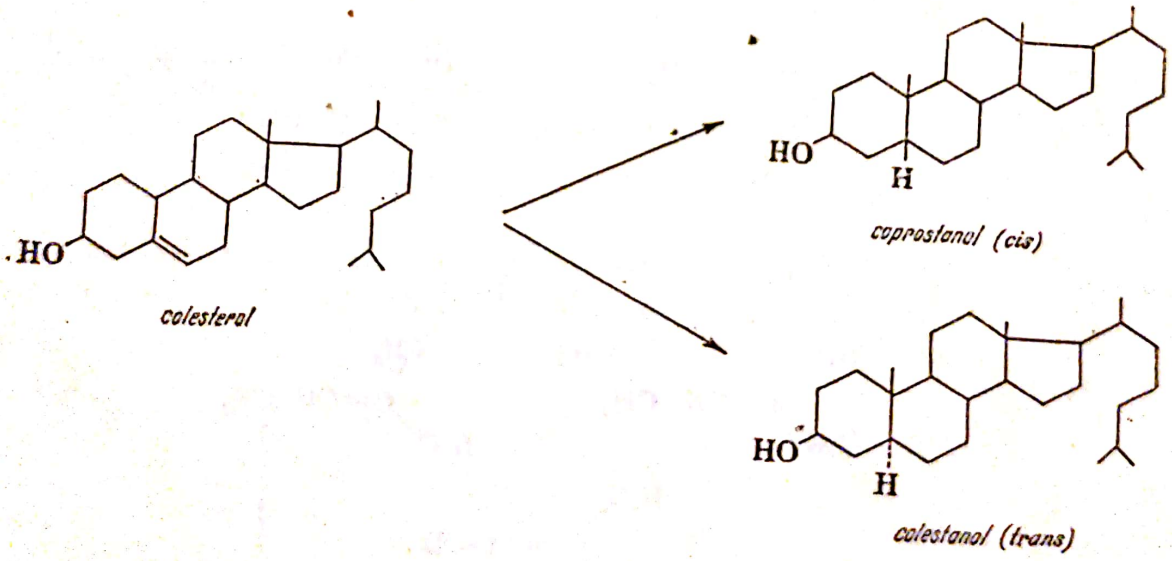
Lanosterolul se transformă, prin parcurgerea mai multor etape, care implică printre altele formarea unor derivați intermediari ca zimosterolul și desmosterolul, în colesterol :



scualen lanesterol

Se disting două aspecte ale catabolizării colesterolului și anume: catabolizarea reală, constînd în transformarea în produși care se elimină prin fecale, și transformarea în alte substanțe de mare interes biologic; în cel de al doilea caz, colesterolul constituie punctul de plecare al unor procese anabolice: formarea hormonilor cu structură sterolică (hormonii corticosuprarenali, hormonii sexuali masculini și feminini), acizii biliari, vitamina D_3 și alți derivați. Formarea acizilor biliari are loc exclusiv în ficat, cea a hormonilor cu structură sterolică în cortexul suprarenal, testicul și ovare, iar a vitaminei D_3 în piele. Sinteza acizilor biliari a fost descrisă în capitolul „Lipide"; hormonii steroizi vor fi prezentați în capitolul „Procese de autocontrol și reglare".

Reducerea colesterolului are loc în intestinul gros, unde este hidrogenat sub acțiunea enzimelor pe care le conține flora intestinală, în colestanol și coprostanol, forme sub care se elimină prin fecale:



colesterol coprostanol (cis) colestanol (trans)

8.5. REGLAREA METABOLISMULUI LIPIDIC

Țesutul adipos constituie una din formele de rezervă energetică ale organismului, el fiind furnizorul de bază al acizilor grași liberi pentru majoritatea celorlalte țesuturi și organe. De aceea, reglarea metabolismului

Scanned with OKEN Scanner

trigliceridelor la nivelul acestui ţesut condiţionează în cea mai mare măsură echilibrul între catabolismul şi anabolismul lipidic al întregului organism. Ţesutul adipos conţine peste 95% trigliceride, 0,15% fosfolipide, mai puţin de 0,25% digliceride şi urme de monogliceride şi acizi graşi liberi. În condiţii fiziologice, la nivelul acestui ţesut se menţine un echilibru dinamic între lipoliză şi lipogeneză prin acţiunea complexă a mai multor factori de control de natură neurohormonală, la care se asociază factorii de nutriţie şi metabolici.

În condiţiile postului şi inaniţiei necesităţile energetice ale organismului se satisfac pe seama mobilizării acizilor graşi; în primele 15 ore de post această mobilizare rezultă din reducerea lipogenezei, iar după două zile de post prin accentuarea lipolizei. Reducerea lipogenezei se datorează atît diminuării metabolizării glucozei furnizoare şi glicerofosfat, cît şi diminuării acizilor graşi liberi endogeni. Accentuarea lipolizei în vederea eliberării acizilor graşi are loc prin activarea *trigliceridlipazei*, enzimă hormonosensibilă.

Hormonul care frînează lipoliza şi împiedică creşterea concentraţiei acizilor graşi liberi în sînge este insulina. Ţesutul adipos constituie un sediu important al activităţii acestui hormon, iar intervenţia lui în metabolismul lipidic se poate exercita pe mai multe căi:

— măreşte permeabilitatea pentru glucoză a membranei adipocitului şi susţine influxul acizilor graşi liberi spre adipocit. Prin asigurarea ţesutului cu glucoză este susţinută lipogeneza, deoarece pe de o parte prin glicoliză se furnizează dihidroxiacetonfosfatul necesar formării *L*-3-glicerofosfatului, glicerokinaza lipsind din adipocit; iar pe de altă parte, prin întreţinerea oxidării prin ciclul acizilor tricarboxilici, se asigură sinteza *de novo* a acizilor graşi formîndu-se acid citric şi ATP; în sfîrşit, prin ciclul pentozofosfat se furnizează NADPH necesar sintezei acizilor graşi. Acizii graşi sintetizaţi sînt reesterificaţi, susţinînd astfel lipogeneza;

— stimulează sinteza unor enzime indispensabile sintezei *de novo* a acizilor graşi ca: acetil-CoA-carboxilaza, enzima de desfacere a citratului, malatdehidrogenaza şi glucozo-**6**-fosfatdehidrogenaza;

— reduce acţiunea lipolitică a hormonilor ce acţionează prin intermediul AMP_c, implicit reduce activitatea trigliceridlipazei prin inhibarea adenilfosfodiesterazei, enzima care catalizează formarea **5′**-AMP din AMP_c. Efectul insulinei asupra acestui metabolism se resimte în special în diabet.

Organismele diabetice bine hrănite vor avea o cetozemie, hipertrigliceridemie şi o acumulare de lipide în ficat şi rinichi ca urmare a creşterii lipolizei la nivelul ţesutului adipos. Administrarea de insulină reduce lipoliza şi ca urmare nivelul acizilor graşi liberi din sînge.

Hormonii lipolitici (adipocinetici) care stimulează lipoliza ca: noradrenalina, adrenalina, ACTH, TSH, glucagonul, unele peptide hipofizare, pot avea acţiune imediată; alţii ca STH şi glucocorticoizii au o acţiune latentă.

Hormonii cu acţiune imediată determină o intensificare a lipolizei acţionînd prin intermediul AMP_c, activator eficient al trigliceridlipazelor. Efectele acestor hormoni sînt accentuate de derivaţii metilxantinei, şi anume de cofeină, teofilină şi teină, care inhibă fosfodiesteraza, enzimă ce

Scanned with OKEN Scanner

transformă AMP_c în 5'-AMP. Activitatea acestor hormoni este redusă de insulină şi de prostaglandină E_1, ambele determinînd scăderea concentraţiei AMP_c din adipocit.

Deoarece actomicina D, puromicina, cicloheximida împiedică acţiunea lipolitică a hormonilor cu acţiune latentă, înseamnă că aceştia acţionează prin stimularea sintezei proteinelor ce intră în structura adenilciclazei, enzimă ce catalizează sinteza AMP_c din ATP.

Sistemul nervos simpatic stimulează lipoliza mai ales atunci cînd organismul necesită energie în mod brusc şi anume în eforturi fizice, expunere la frig sau în cazul *stress*-urilor. În acest caz, lipoliza este extrem de rapidă, dar de scurtă durată şi se datorează în special efectului determinat de norepinefrină, care acţionează probabil prin intermediul receptorilor localizaţi în membrana adipocitului.

Metabolismul colesterolului este şi el riguros controlat, fiind influenţat de concentraţia hepatică a colesterolului, precum şi de dinamica metabolismului glucidic, lipidic şi, într-o măsură mai mică, de cel proteic. De o mare importanţă este şi compoziţia dietei, o hrană bogată în lipide accelerînd sinteza colesterolului, iar un regim sever, acalorigen, i-o va diminua ca urmare a metabolizării prioritare a acetil-CoA pe calea ciclului K r e b s.

Transportul colesterolului de la locul sintezei spre celelalte organe are loc prin sînge, fiind vehiculat prin formarea unor complexe cu lipoproteinele (β-lipoproteine), în structura cărora se găseşte liber sau esterificat (procesul are loc în ficat, intestin şi hematii). Sinteza şi degradarea colesterolului sînt influenţate şi de diverşi alţi factori.

Scanned with OKEN Scanner

9 METABOLISMUL PROTEIC

Viaţa nu este posibilă fără existenţa proteinelor, biopolimerii cei mai răspîndiţi ai organismelor vii (reprezentînd peste 50% din totalul greutăţii lor uscate) indiferent de gradul lor de organizare. Funcţiile biologice ale proteinelor depind de complexitatea proceselor metabolice care se desfăşoară în organismul respectiv şi pot avea, în cazul mamiferelor, diferite roluri : de catalizator (enzime), în contracţia musculară (actină şi miozină), în transportul unor gaze sau diverse substanţe (hemoglobină, albumină, globuline), în protecţia organismului (imunogamaglobuline), în structura unor compuşi biologici activi, ca hormonii sau în diverse alte structuri ca elastina, colagenul, scleroproteinele.

Proteinele sînt specifice fiecărui organism şi se sintetizează endogen, neputînd să fie preluate din alimente, gata formate. Prin urmare, pentru sinteza celor aproximativ cinci milioane de proteine pe care le conţin cele mai evoluate mamifere, inclusiv omul, este necesară prezenţa, în cantităţi suficiente, a celor 22 de aminoacizi care intră în structura lor. Dar numai o parte din aminoacizi se pot sintetiza endogen, din diverşi precursori. Se apreciază că în organismul uman nu se pot sintetiza, într-o cantitate care să poată face faţă necesităţilor sintezei continue a numeroaselor proteine decît 10 aminoacizi, care sînt denumiţi aminoacizi neesenţiali. Restul de 12 aminoacizi trebuie introduşi în organism prin alimente şi sînt denumiţi aminoacizi esenţiali.

În multe microorganisme are loc sinteza tuturor aminoacizilor, pornindu-se de la substanţe simple, şi anume de la amoniac, CO_2 şi apă. Sinteza tuturor aminoacizilor are loc, de asemenea, şi în majoritatea plantelor, de aici ajungînd, prin hrană, la mamifere.

Aminoacizii, eliberaţi prin procesele de digestie din proteinele alimentare de origine animală sau vegetală, sînt absorbiţi şi transportaţi prin vena portă la ficat. În acest organ are loc o depozitare a aminoacizilor şi apoi o redistribuţie în funcţie de necesităţile tuturor celorlalte organe. Pentru a înţelege necesitatea unui aport continuu endogen sau exogen a aminoacizilor trebuie reţinut că la un bărbat de 70 kg se metabolizează aproximativ 400 g proteine pe zi. Din această cantitate, circa 100 g de aminoacizi sînt oxidaţi pînă la bioxid de carbon şi apă cu produ-

cere de energie, restul fiind reutilizaţi printr-un schimb dinamic cu aminoacizii din diverse proteine. Acesta este motivul pentru care, chiar dacă nu se introduce în organism nici un aliment în compoziţia căruia să intre proteine, în medie se elimină prin urină 5 g azot proteic pe zi, ceea ce este echivalent cu metabolizarea a aproximativ 30 g proteine endogene.

Eliminarea azotului proteic provenit prin metabolizarea aminoacizilor se face aproape în totalitate prin urină şi numai o mică parte prin fecale. Eliminarea are loc mai ales sub formă de amoniac şi uree, în cantităţi foarte mici sub forma altor compuşi azotaţi.

În funcţie de raportul dintre azotul proteic introdus şi cel eliminat, se disting trei situaţii distincte : o *balanţă azotată echilibrată* cînd azotul ingerat este egal san aproape egal cu cel excretat, o *balanţă pozitivă* cînd azotul ingerat este într-o cantitate mai mare, şi o *balanţă negativă* cînd azotul eliminat este mai mare. Prima situaţie se întîlneşte la omul sănătos, matur, cea de a doua situaţie în cazul unui organism în creştere, în sarcină sau în convalescenţă, iar cea de a treia o întîlnim în stări febrile, după diverse traumatisme sau la organismele subalimentate. Cu ajutorul proteinelor alimentare cu aminoacizi marcaţi s-a putut aprecia că aceştia se încorporează în proteinele proprii într-o proporţie de 60%, 7% fiind incorporaţi în alţi compuşi azotaţi, 30% se elimină prin urină şi 3% prin fecale.

Din cele arătate, reiese că aminoacizii liberi, care formează un fond metabolic caracteristic fiecărui organ, se află într-o dinamică permanentă rezultată din schimbul cu cei din structura proteinelor, participarea la sinteza *de novo* a proteinelor, oxidarea unora dintre ei cu producere de energie sau participarea la sinteza altor compuşi biologici activi.

9.1. DIGESTIA PROTEINELOR

S-a apreciat că necesarul zilnic de proteine pentru un adult este de minimum 40 g ; proteinele nu pot fi utilizate ca atare, deci sînt descompuse prin proteoliză în unităţile lor structurale, proces care începe în stomac, după ce în prealabil s-a produs o mărunţire a alimentelor în gură prin masticaţie. La nivelul stomacului, majoritatea proteinelor sînt mai întîi denaturate datorită prezenţei acidului clorhidric care creează mediul puternic acid ($pH = 1—1{,}5$) al sucului stomacal. Prin denaturarea ireversibilă a proteinelor se uşurează acţiunea *pepsinei*, enzima proteolitică care produce o primă scindare a proteinelor. Pepsina face parte din grupul endopeptidazelor, enzime care acţionează în interiorul lanţului polipeptidic, scindînd fragmente cu mase moleculare relativ mari.

Acidul clorhidric, în afară de faptul că denaturează proteinele, mai are şi rolul deosebit de important de a cataliza formarea pepsinei active din compusul inactiv pepsinogen (v. „Hidrolazele" în cap. Enzime).

Proteoliza se continuă în intestinul subţire unde peptidele sînt scindate de alte endopeptidaze ca *tripsina*, *chimotripsina* şi *elastaza*, iar aminoacizii se eliberează sub acţiunea exopeptidazelor ca *aminopeptidaza*, *carboxipeptidaza* şi *dipeptidaza*, care desfac cîte un aminoacid din capătul care conţine gruparea aminică, respectiv carboxilică liberă. Toate aceste enzime sînt sintetizate în pancreas şi sînt iniţial eliberate din celule sub

Scanned with OKEN Scanner

formă inactivă, de zimogeni; activarea lor are loc în toate cazurile prin îndepărtarea hidrolitică, autocatalizată, a unui fragment peptidic format dintr-un număr diferit de aminoacizi.

Acţiunea tuturor acestor proteinaze, reglată de numeroşi factori, este specifică, desfăcînd legătura peptidică formată între anumiţi aminoacizi. De exemplu, pepsina desface legătura peptidică în care este angajat un acid monoaminodicarboxilic (acidul glutamic sau acidul aspartic), chimotripsina — legătura în care participă un aminoacid cu ciclu aromatic (tirozina sau fenilalamina), tripsina — legătura în care ia parte lizina sau arginina, iar elastaza desface legătura în care participă aminoacizii alifatici.

9.2. ABSORBŢIA AMINOACIZILOR

Absorbţia are loc la nivelul intestinului subţire printr-un proces activ, la care participă obligatoriu ionii de sodiu într-un mod încă incomplet precizat. Se pare că, similar absorbţiei hexozelor, există o serie de cărăuşi specifici unuia sau mai multor aminoacizi. Cercetări recente au demonstrat că nu toţi aminoacizii eliberaţi din proteine se regăsesc în vena portă după aceeaşi perioadă de timp; mai mult decît atît, în unele cazuri ei se află în proporţii complet diferite de cele în care au existat în proteina nativă. De exemplu, alanina se regăseşte în vena portă în cantităţi mult crescute faţă de procentul iniţial din proteină, iar acidul glutamic şi acidul aspartic mult sub acesta; ceea ce face să se presupună că la nivelul intestinului au loc procese metabolice complexe încă neprecizate. Aceste date au fost confirmate şi prin analizarea în timp a concentraţiei serice a unui amestec de aminoacizi introduşi prin perfuzie direct în curentul sanguin, condiţii în care nu se mai regăsesc diferenţele cantitative şi calitative menţionate.

9.3. PROCESE GENERALE DE METABOLIZARE A AMINOACIZILOR

În sînge, ca şi în toate organele, se găseşte un anumit fond metabolic de aminoacizi liberi. Aceştia pot fi de origine exogenă (alimentară) sau endogenă, eliberaţi din proteinele tisulare. Procesul de proteoliză endogenă, incomplet cunoscut încă, are loc practic în toate celulele însă cu intensităţi diferite şi se desfăşoară sub acţiunea unor proteaze specifice, denumite *catepsine*. Catepsinele au mecanisme de acţiune şi *p*H-uri optime similare cu enzimele digestive. Acţiunea acestora este riguros controlată, păstrîndu-se un raport strîns între sinteză şi degradare.

Fiecare aminoacid are un mod particular de a se metaboliza; există însă şi modalităţi generale de metabolizare, comune tuturor aminoacizilor, cum sînt procesele de transaminare, decarboxilare şi dezaminare.

Metabolizarea aminoacizilor depinde de o serie de factori de bază, cum ar fi : gradul de nutriţie a organismului respectiv, vîrsta şi starea sa fiziologică, condiţiile climaterice, natura şi intensitatea activităţilor fizice sau intelectuale etc. De asemenea, metabolizarea lor depinde de cantitatea substanţelor energizante (glucoză, acizi graşi liberi sau corpi cetonici), de necesitatea sintezelor unor biomolecule ca baze purinice sau pirimidinice, hormoni, coenzime etc. sau de sinteza unor biopolimeri, ca proteinele sau acizii nucleici. Aceste interrelaţii sînt redate în figura 56 :

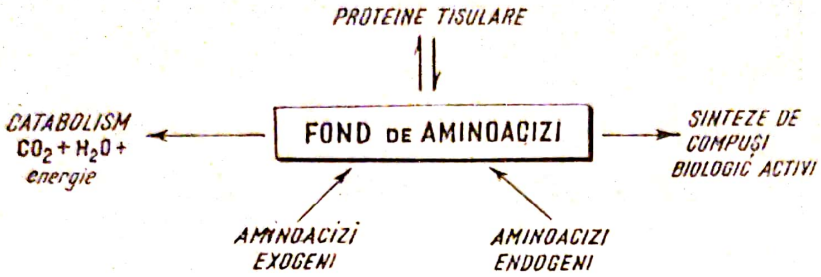


Fig. 56. Fondul de aminoacizi şi corelaţiile cu procesele metabolice.

Rolul aminoacizilor liberi din organism este deosebit de complex, distingîndu-se aspecte anabolice şi catabolice. În anabolism aminoacizii participă la sinteza proteinelor (holo- şi heteroproteinelor) tipice fiecărui organ sau ţesut, precum şi la sinteza altor componente de mare importanţă dintre care amintim hemul, creatina, bazele purinice şi pirimidinice, coenzima A, hormonii derivaţi de la aminoacizi sau, a unor componente ce intră în structura lipidelor complexe, cum sînt colina şi colamina. În catabolism, în mod arbitrar deosebit de anabolism, se poate încadra participarea aminoacizilor în ciclul ureogenetic, în sinteza glutaminei, în unele procese de detoxifiere, ca şi în oxidarea prin ciclul K r e b s.

9.3.1. TRANSAMINAREA

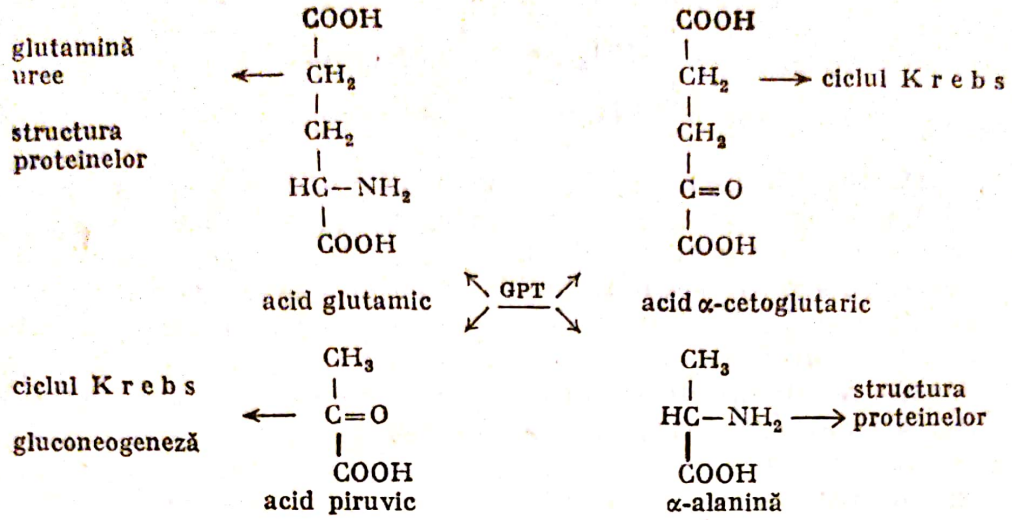
Transaminarea constă în procesul de transfer a grupării amino de pe un aminoacid pe un cetoacid. La acest proces pot participa mai mult de jumătate din aminoacizii prezenţi în fondul metabolic al organismului, cum sînt : acidul glutamic, acidul aspartic, alanina, arginina, lizina, triptofanul, tirozina, fenilalanina, valina, leucina, cisteina.

Transaminările au un rol metabolic deosebit de important, asigurînd sinteza continuă a numeroşi aminoacizi şi a cetoacizilor corespunzători, aşa cum este cazul sintezei reciproce a acidului piruvic şi a alaninei, a acidului glutamic şi a acidului α-cetoglutaric sau a acidului aspartic şi a acidului oxalacetic. Deşi se poate forma atît aminoacidul, cît şi cetoacidul corespunzător, reacţia fiind reversibilă, echilibrul este îndreptat prioritar spre formarea componentului necesar organului respectiv în momentul dat.

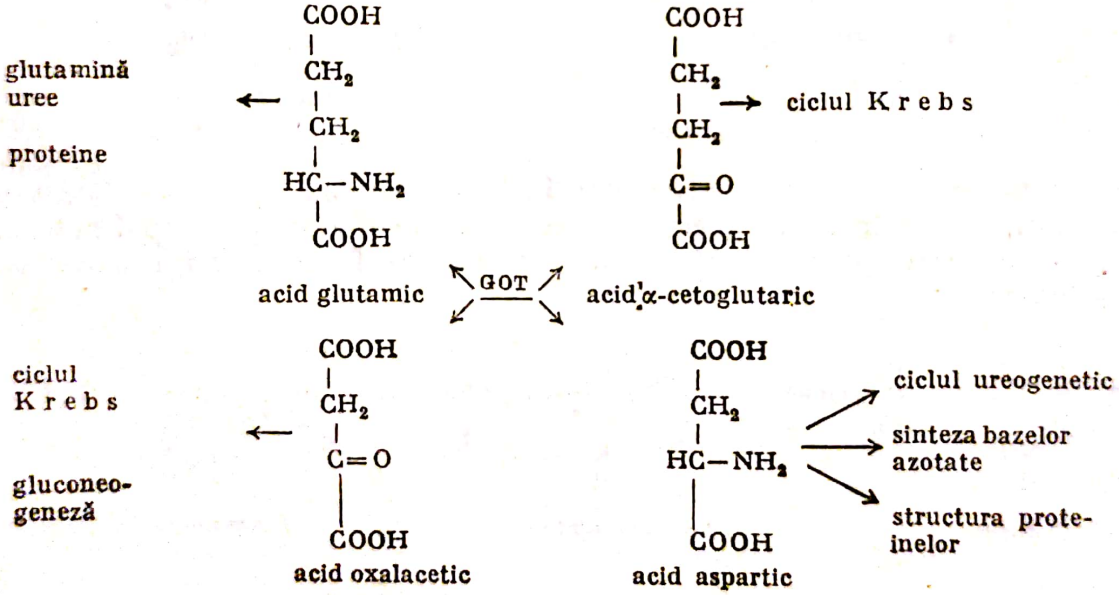
În capitolul „Enzime" s-a specificat că cele mai importante transaminaze sînt GOT şi GPT, arătîndu-se şi utilitatea determinării concentra-

Scanned with OKEN Scanner

ţiei lor serice. GPT catalizează procesul reversibil de transfer al grupării amino de pe acidul glutamic pe acidul piruvic cu formarea simultană a acidului α-cetoglutaric şi alaninei :



Se poate constata că fiecare din cele patru componente participante în aceste procese reversibile se metabolizează ulterior prin căi particulare sau generale de mare interes metabolic. Aceeaşi situaţie se întîlneşte şi în cazul celeilalte enzime, GOT :

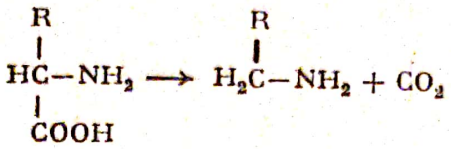


Iese cu uşurinţă în evidenţă faptul că prin procesele de transaminare se realizează o corelare între cele trei metabolisme de bază, glucidic, lipidic şi protidic.

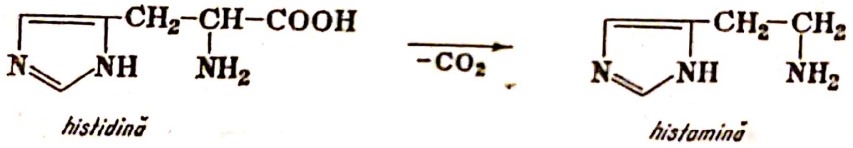
9.3.2. DECARBOXILAREA

Decarboxilarea constituie alt proces general de metabolizare a aminoacizilor, prin care se formează aminele corespunzătoare. Reacţia este ireversibilă şi este catalizată de enzime specifice, care, în marea lor majori-

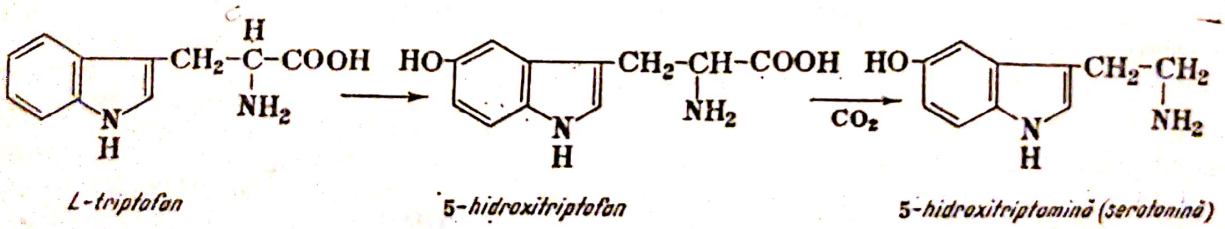
tate, au drept coenzimă tot piridoxalfosfatul :



Aminele care se formează pot fi încadrate în trei grupe după acțiunea sau rolul lor metabolic. În prima categorie sînt încadrate *aminele cu funcții biologice*; majoritate, de la aminoacizii ciclici. Astfel, din histidină se formează *histamină*, procesul avînd loc în celule specializate, grupate mai ales în jurul vaselor sangvine, în membrana pleurală și în mucoasa stomacului. În acele celule se sintetizează în afară de histamină și *heparina*, un mucopolizaharid care are mai multe funcții, printre care și inhibarea coagulării sîngelui. Histamina are multe efecte fiziologice, cele mai importante dintre acestea fiind dilatarea capilarelor, contracția mușchilor netezi bronhiali și intensificarea secreției mucoasei gastrice, mai cu seamă a acidului clorhidric. Sinteza histaminei crește în reacțiile alergice, acțiunea ei putînd fi anihilată de o serie de substanțe cu efect antihistaminic.

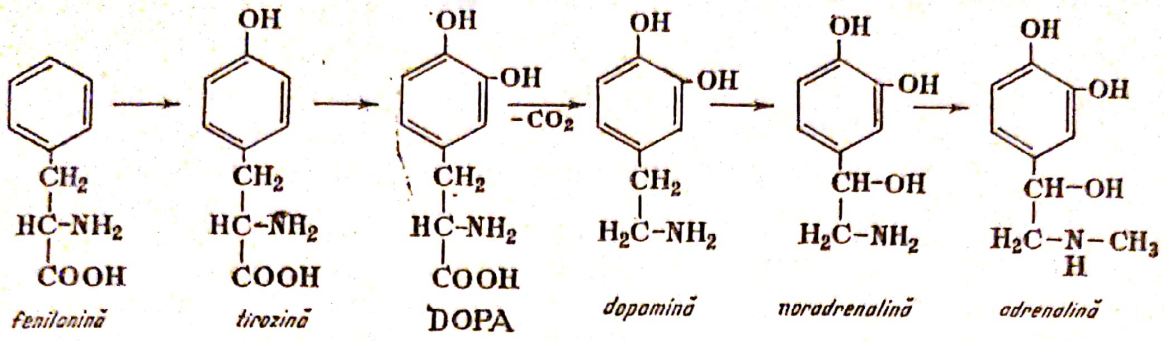


Altă amină biologică activă este **5**-*hidroxitriptamina*, a cărei biosinteză pornește de la triptofan ; acesta se transformă prin hidroxilare în **5**-hidroxitriptofan, care, prin decarboxilare, generează **5**-hidroxitriptamina sau *serotonina* :



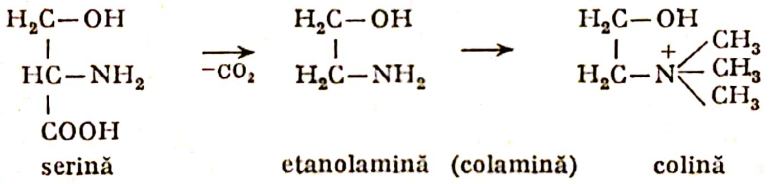
Serotonina se formează mai ales în sistemul nervos și în mucoasa intestinală ; are numeroase efecte printre care și acela de vasoconstrictor (v. și „Sisteme de autocontrol și reglare").

În categoria aminelor biologice se pot încadra și doi hormoni, *adrenalina* și *noradrenalina*, sintetizați în medulosuprarenală. Biogeneza lor pornește de la fenilalanină care, după o serie de hidroxilări succesive, formează un compus denumit **3,4**-dihidroxi-*L*-fenilalanină ; aceasta se decarboxilează și ulterior, printr-o nouă hidroxilare, se transformă în noradrenalină care, la rîndul ei, se transformă în adrenalină prin metilarea grupării aminice.

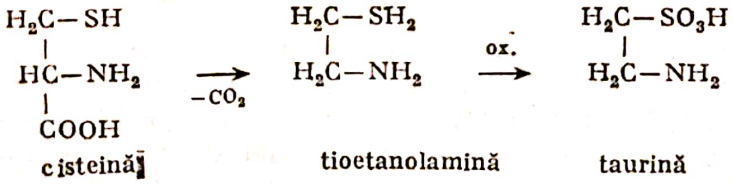


O altă amină biologică importantă, inclusă în aceeaşi categorie, este GABA, format prin decarboxilarea acidului glutamic, procesul fiind tipic celulelor cerebrale.

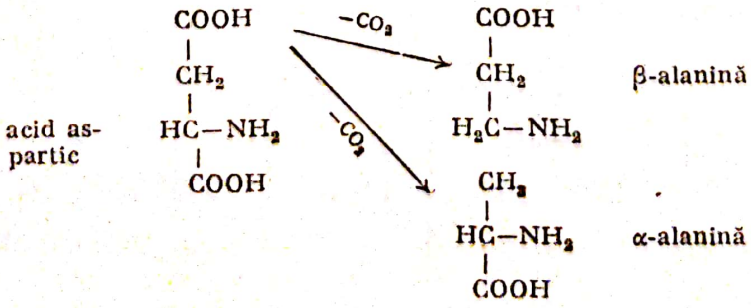
A doua grupă este formată din *aminele structurale*, care devin componente ale unor substanţe de mare importanţă, ca fosfolipidele, acizii biliari sau coenzima A. Dintre aceste amine cu rol structural citäm *etanolamina*, care se formează prin decarboxilarea serinei şi care, printr-o metilare ulterioară, se transformă în *colină*. Etanolamina intră în structura lecitinelor, iar colina în cea a cefalinelor :



În structura acizilor biliari se întîlneşte *taurina*, substanţă formată prin decarboxilarea şi oxidarea cisteinei :



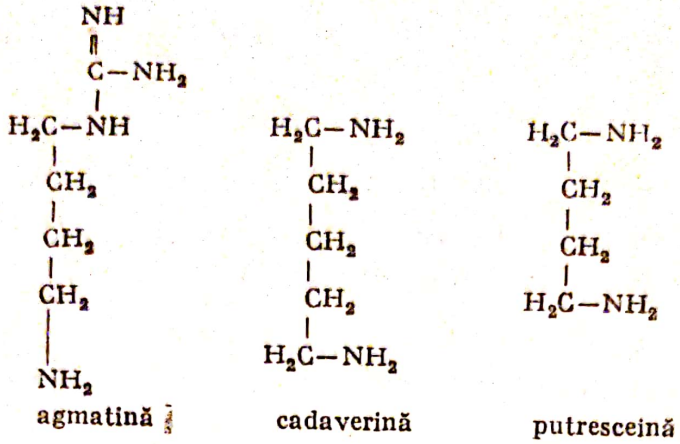
Prin decarboxilarea acidului aspartic se poate forma α-alanină sau β-alanină, ultima fiind un component al coenzimei A şi al PTA :



Cea de a treia grupă de amine este reprezentată de *aminele toxice*, care iau naştere în intestin sub acţiunea enzimelor pe care le conţin microorganismele din flora intestinală. Din lizină se formează *cadaverină*, din

Scanned with OKEN Scanner

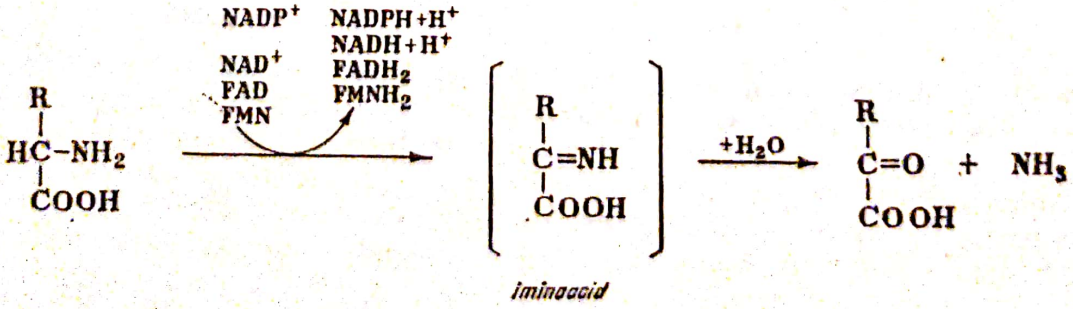
arginină *agmatină*, iar din ornitină *putresceina*:



9.3.3. DEZAMINAREA OXIDATIVĂ

Dezaminarea oxidativă a aminoacizilor constituie cel de al treilea proces general de metabolizare a aminoacizilor, proces prin care aceştia se transformă în cetoacizii corespunzători, eliberînd amoniac. Procesul chimic propriu-zis este o dehidrogenare, în care, ca acceptor de hidrogen participă FMN, FAD, NAD^+ sau $NADP^+$. Se cunosc mai multe sisteme enzimatice de dehidrogenare dintre care *L-aminoacidoxidaza* avînd coenzimă FMN acţionează asupra majorităţii aminoacizilor, cu cîteva excepţii cum ar fi lizina, şi *D-aminoacidoxidaza*, care conţine ca grupare prostetică FAD, a cărei funcţie biologică nu este încă precizată deoarece, după cum se ştie, practic toţi aminoacizii din organismul nostru aparţin seriei *L* şi nu celei *D*.

Cea mai importantă enzimă din această categorie este *L-glutamicdehidrogenaza*, care conţine în structura sa NAD^+ sau $NADP^+$. Activitatea ei este strîns corelată cu procesele de sinteză ale ureei, marea majoritate a amoniacului eliminat sub această formă derivînd din gruparea aminică a acidului glutamic. Toate aceste enzime sînt localizate prioritar în ficat şi au ca mecanism de acţiune etapele redate mai jos, implicîndu-se formarea iniţială prin dehidrogenare a unui compus instabil, un iminoacid, care se hidrolizează spontan, generînd un cetoacid:



Glutamatdehidrogenaza este o enzimă alosterică, reglată de numeroşi factori şi constituită prin unirea mai multor subunităţi protomerice.

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

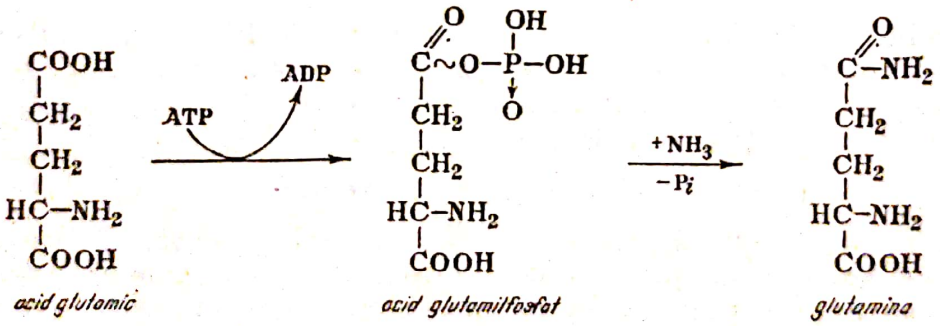
9.3.4. METABOLISMUL AMONIACULUI

Amoniacul, produs catabolic toxic, se formează continuu şi în cantităţi relativ mari în organism ca urmare a dezaminării aminoacizilor, bazelor purinice şi pirimidinice, precum şi a altor compuşi azotaţi; cu toate acestea, concentraţia sa în sînge este de abia 0,1—0,2 mg%, fiind foarte scăzută şi în ţesuturi şi organe. Pentru a se menţine în aceste limite, inofensive pentru organism, sînt necesare procese de detoxifiere eficientă. Aceste procese sînt reprezentate de ciclul ureogenetic şi de sinteza glutaminei. Ureea se formează exclusiv în ficat, în timp ce glutamina se sintetizează practic în toate celulele, acolo unde se eliberează amoniacul.

Formarea amoniacului are loc cu precădere în ficat, muşchi, rinichi, creier şi intestin (sub acţiunea florei intestinale), iar concentraţia sa în sînge creşte în cursul eforturilor musculare sau după o activitate intensă cerebrală. Creierul este cel mai sensibil organ chiar la creşteri minime ale concentraţiei amoniacului liber peste limitele menţionate. Creşterea concentraţiei amoniacului în sînge şi alte organe se traduce prin intoxicaţii ce pot provoca chiar şi moartea. Hiperamoniemia se constată mai ales în cazul tulburărilor cronice hepatice, deci cînd funcţiile de detoxifiere ale organismului sînt deficitare.

9.3.5. METABOLISMUL GLUTAMINEI

Pentru a se împiedica creşterea concentraţiei amoniacului peste limitele normale, sinteza glutaminei se face proporţional cu concentraţia acestuia. Procesul, catalizat de enzima *glutaminsintetază*, necesită activarea prealabilă a acidului glutamic prin intermediul ATP:



acid glutamic — *acid glutamilfosfat* — *glutamina*

Glutaminsintetaza este o enzimă cu caracteristici alosterice, activitatea ei fiind riguros controlată de diverşi efectori; ea este formată din numeroase subunităţi identice cu mase moleculare medii de 50 000 care se unesc coordinativ, masa oligomerului atingînd 500—600 000 şi avînd locusuri de legare specifice pentru acidul glutamic, amoniac şi diverşii efectori.

Glutamina are trei roluri metabolice principale, şi anume: de detoxifiere a organismului împotriva efectelor nocive ale amoniacului, de trans-

port prin sînge a amoniacului neutralizat (concentraţia sa fiind între 6—10 mg%) şi de donator de amoniac rinichilor, în vederea neutralizării compuşilor cu caracter acid, sau ficatului, pentru numeroase procese de biosinteză.

Glutamina din sînge, ajunsă la nivelul rinichilor sau ficatului, este desfăcută în componentele iniţiale — acid glutamic şi amoniac — sub acţiunea unei alte enzime, *glutaminaza*. La nivelul rinichilor, amoniacul, neutralizînd compuşi cu caracter acid, menajează rezervele alcaline ale acestora. În ficat, glutamina participă în procesele de biosinteză, de exemplu la biosinteza bazelor purinice şi pirimidinice (fig. 57):

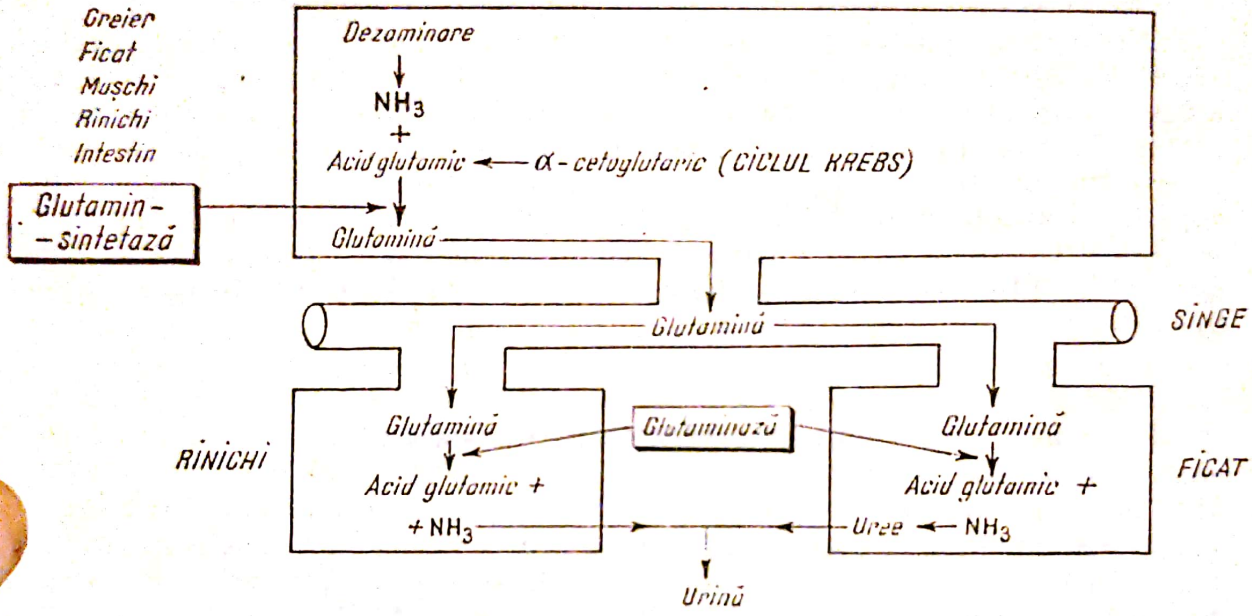


Fig. 57. Metabolismul glutaminei.

Trebuie subliniat faptul că acidul glutamic liber, găsindu-se într-o cantitate limitată la nivelul organelor şi mai ales al creierului, se sintetizează intens prin transaminarea acidului α-cetoglutaric; astfel, sinteza glutaminei este strîns corelată cu ciclul K r e b s.

9.3.6. CICLUL UREOGENETIC

Dacă sinteza glutaminei are loc în numeroase ţesuturi şi organe, sinteza ureei are loc aproape în exclusivitate în ficat, şi anume în mitocondri, într-o cantitate extrem de mică sintetizîndu-se şi în creier. La sinteză participă trei aminoacizi, arginina, ornitina şi citrulina, dintre care ultimii doi sînt specializaţi în acest proces, nefiind întîlniţi în structura proteinelor. Compusul care ia naştere, ureea, este o substanţă solubilă în apă, fapt care-i permite să circule prin sînge, ajungînd astfel la rinichi, de unde este eliminată prin urină, fiind una din substanţele fără prag renal.

Pentru realizarea sintezei ureei este necesară participarea simultană a trei procese distincte: dezaminarea oxidativă a aminoacizilor (mai ales a acidului glutamic şi a celui aspartic), transaminarea şi ciclul K r e b s. Sediul acestor procese fiind mitocondria este explicabil de ce şi sinteza ureei are loc în această formaţiune subcelulară.

Schema generală a procesului şi a interrelaţiilor sale cu celelalte reacţii de care depinde acesta este redată mai jos (fig. 58):

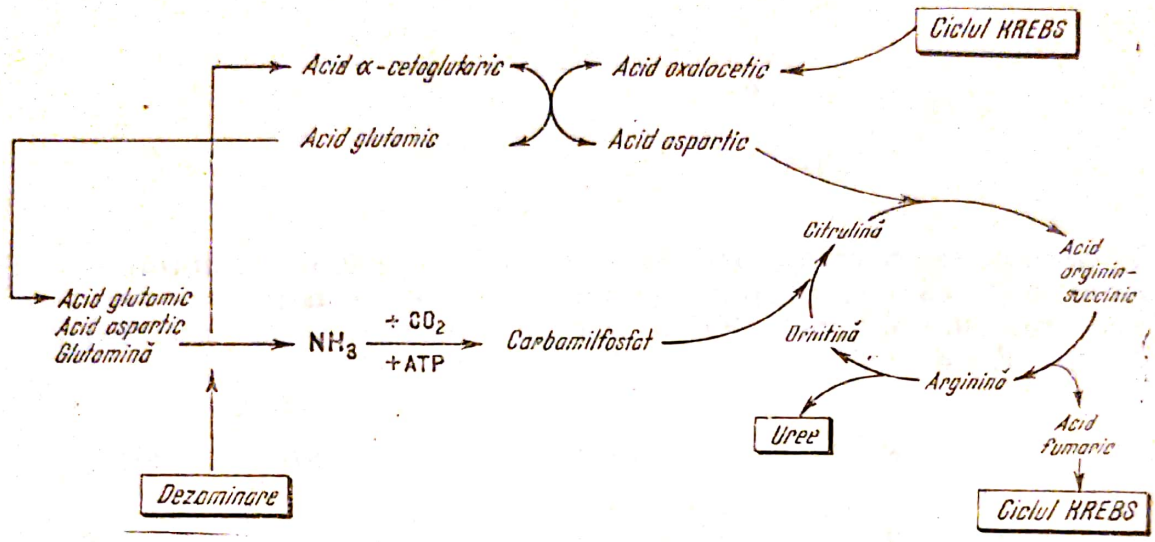
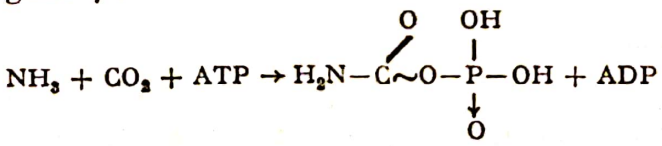


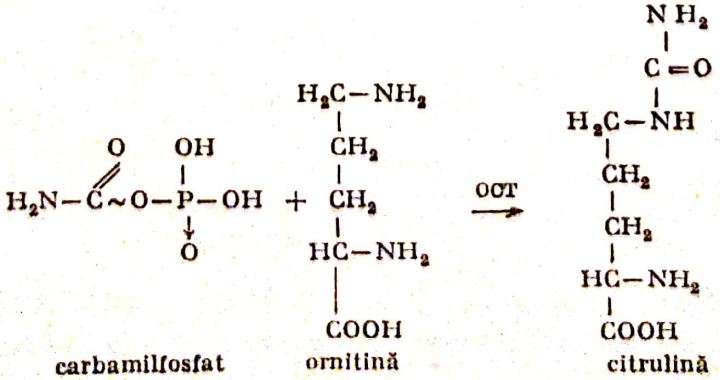
Fig. 58. Ciclul Krebs şi corelaţiile sale metabolice.

În prima etapă, amoniacul format, mai ales prin dezaminarea acidului glutamic, dar şi din acid aspartic, glutamină şi alţi aminoacizi, se condensează cu o moleculă de CO_2 în prezenţa obligatorie a ATP ca donator de energie şi de grupare fosfat. Reacţia, ca dealtfel toate celelalte reacţii ale ciclului, este ireversibilă, fiind catalizată de *carbamilfosfatsintetază* (v. şi „Ligaze"):



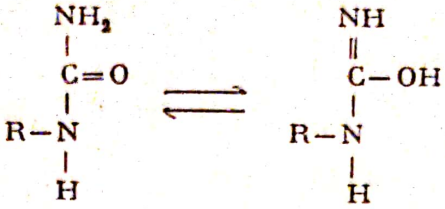
carbamilfosfat

Carbamilfosfatul sintetizat se condensează cu ornitina, formînd citrulina. Enzima care catalizează acest proces se numeşte *ornitincarbamiltransferază* (OCT); această enzimă este dozată în laboratorul clinic pentru precizare de diagnostic, creşteri ale activităţii sale serice fiind datorate exclusiv unor tulburări hepatice:

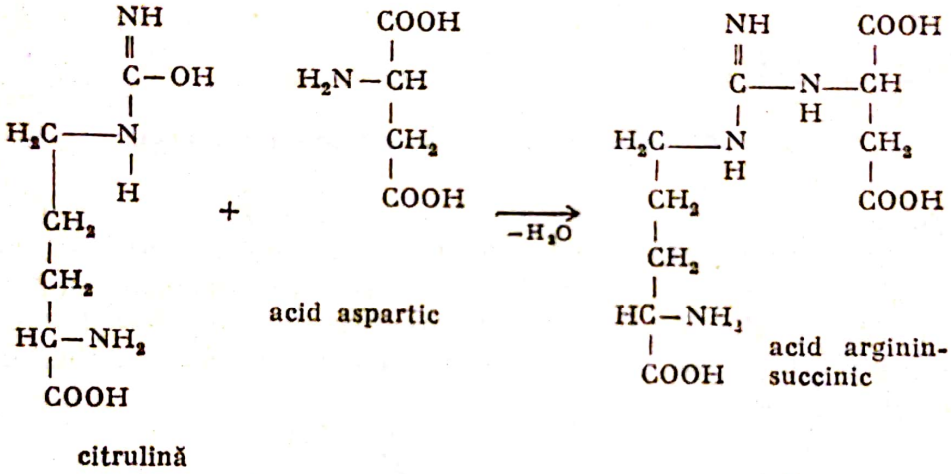


carbamilfosfat ornitină citrulină

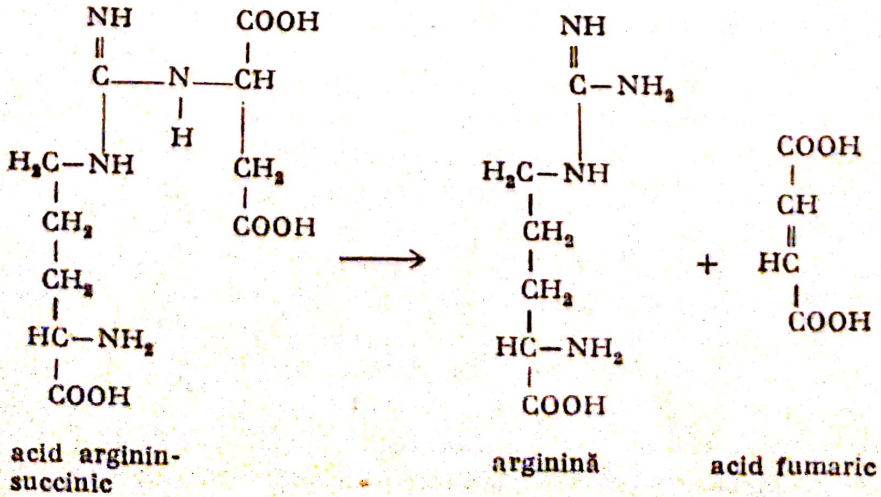
Citrulina, care poate exista sub două forme tautomere, se condensează



în continuare cu acidul aspartic, formîndu-se acidul argininsuccinic. Se reaminteşte că acidul aspartic provine în marea sa majoritate prin transaminarea sub acţiunea GOT a acidului oxalacetic, un intermediar al ciclului Krebs:

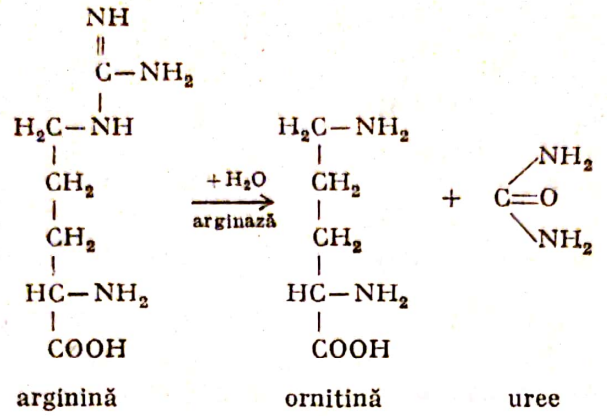


Prin scindarea enzimatică a acidului argininsuccinic se generează cel de al treilea aminoacid al ciclului, arginina, formîndu-se şi acid fumaric; acesta, intermediar al ciclului Krebs, se va metaboliza pe calea cunoscută:



Scanned with OKEN Scanner

În ultima etapă a procesului, arginina se hidrolizează sub acţiunea arginazei, în uree şi ornitină, prin intermediul acestui aminoacid reluîndu-se întregul proces :

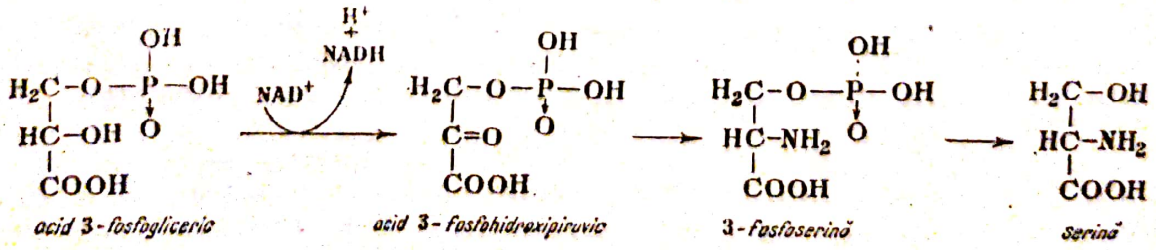


9.4. METABOLISMELE INDIVIDUALE ALE AMINOACIZILOR

Deoarece numai o parte dintre aminoacizi sînt sintetizaţi de organismul uman (aminoacizii neesenţiali) se prezintă mai întîi metabolismul acestora. Gruparea aminoacizilor neesenţiali şi, în continuare, a celor esenţiali se face după compuşii rezultaţi prin catabolism ; din acest punct de vedere se disting aminoacizi cetogeni (care conduc la sinteza de corpi cetonici) şi aminoacizi glucogeni (din care se poate forma glucoza)

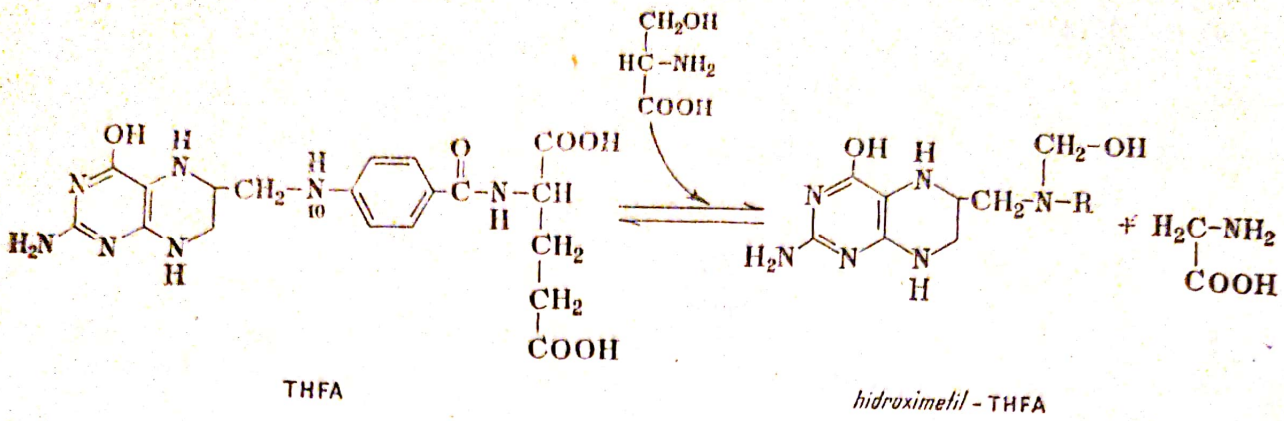
9.4.1. METABOLISMUL AMINOACIZILOR NEESENŢIALI

9.4.1.1. *Serina şi glicocolul* au ca precursor comun un intermediar al glicolizei, şi anume acidul 3-fosfogliceric care prin transaminare se transformă în 3-fosfoserină şi ulterior în serină. Din serină, prin intermediul unei vitamine hidrosolubile, acidul folic, se formează glicocolul :

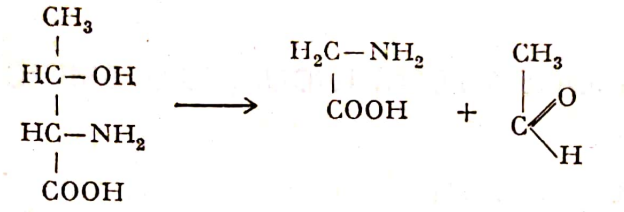


Transformarea are loc prin acceptarea de către acidul folic al unui fragment format dintr-un singur atom de carbon, care ulterior va fi cedat în

diverse procese de sinteză, cum ar fi aceea a bazelor purinice :



Glicocolul se mai poate forma şi prin scindarea enzimatică a treoninei :



Serina şi glicocolul au importante roluri metabolice. În afară de faptul că sînt constituenţi indispensabili ai tuturor proteinelor, mai intră şi în structura a numeroşi componenţi sau participă la sintetizarea lor. Astfel, serina este întîlnită în structura fosfatidilserinei, iar sub formă decarboxilată în fosfatidiletanolamine (cefaline) sau în fosfosfingolipide. Metilarea etanolaminei va genera colina, component al fosfatidilcolinei (lecitine).

Glicocolul este un aminoacid cu funcţii anabolice dintre cele mai importante, fiind precursorul hemului, creatinei şi glutationului; intră în structura acizilor biliari şi participă în procese de detoxifiere, condensîndu-se cu diverşi acizi organici, dintre care acidul benzoic, cu formare de acid hipuric. Această ultimă reacţie reprezintă şi un test al funcţiei de detoxifiere a ficatului (fig. 59) :

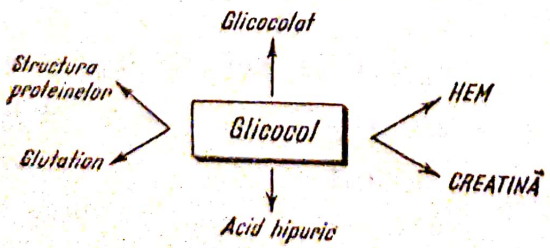


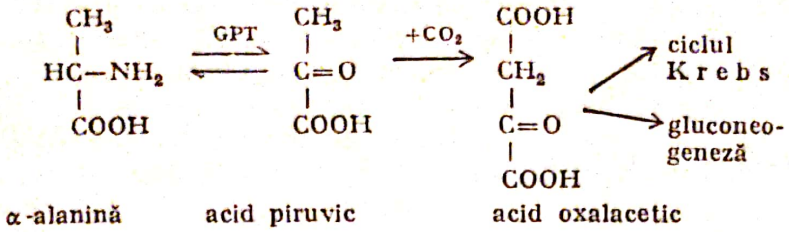
Fig. 59. Glicocolul şi derivaţii săi.

Ambii aminoacizi sînt glucoformatori, prin integrarea lor în ciclul Krebs putîndu-se transforma în acetil-CoA.

9.4.1.2. *Alanina* se poate sintetiza continuu prin transaminarea acidului piruvic în cadrul reacţiei catalizată de GPT. Este un aminoacid întîlnit practic în toate proteinele, fiind cel mai important aminoacid glucoformator. Participarea sa prioritară în procesul de gluconeogeneză se datorează uşurinţei cu care se

Scanned with OKEN Scanner

poate transforma în acid piruvic prin transaminare şi ulterior prin carboxilarea acestuia. Prin decarboxilarea acidului aspartic se poate forma atît α-alanină, cît şi β-alanină :

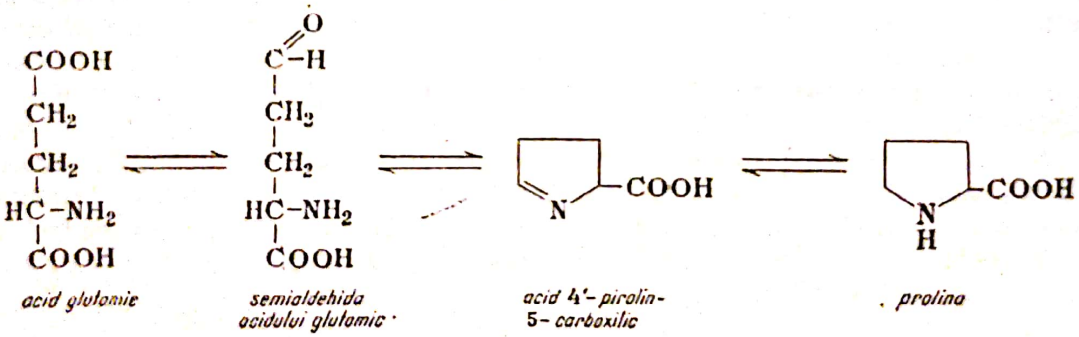


9.4.1.3. *Acidul glutamic, glutamina şi prolina* se pot transforma reciproc.

Biosinteza acidului glutamic are loc pe mai multe căi, cea mai importantă fiind prin intermediul transaminazelor GOT şi GPT. O altă cale importantă de sinteză implică aminarea directă a acidului α-cetoglutaric, conform reacţiei :

$$NH_4^+ + \text{acid } \alpha\text{-cetoglutaric} + NADH + H^+ \rightleftharpoons \text{acid glutamic} + NAD^+$$

De remarcat că la cele două procese de sinteză participă acidul α-cetoglutaric, intermediar al ciclului Krebs ; dealtfel, prin intermediul acestuia, acidul glutamic se şi oxidează pînă la bioxid de carbon şi apă, sintetizînd totodată şi glucoză. Acidul glutamic este în acelaşi timp component al unor biomolecule importante, ca de exemplu glutationul sau acidul folic. Prin amidarea acidului glutamic se formează glutamina, iar prin decarboxilarea sa ia naştere GABA. Acidul glutamic şi prolina se pot transforma reciproc printr-o suită de reacţii reversibile :



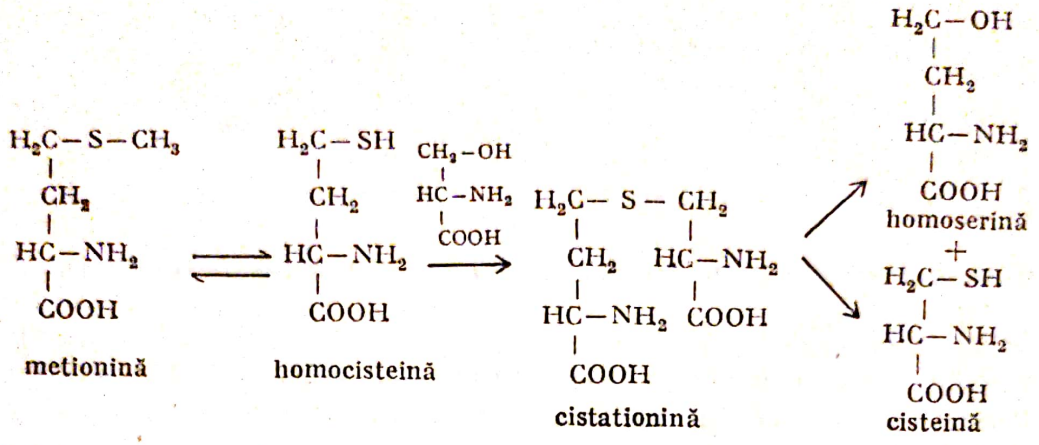
Prolina şi hidroxiprolina se găsesc într-un procent ridicat în colagen, proteină fibrilară de maximă importanţă, prezentă în ţesutul conjunctiv.

9.4.1.4. *Acidul aspartic şi asparagina* derivă unul din altul. Acidul aspartic se sintetizează prin procesele de transaminare cunoscute, precum şi printr-un proces de aminare directă, similar celui descris în cazul acidului glutamic. Este un aminoacid glucoformator, care se poate oxida prin intermediul acidului oxalacetic. Participă în numeroase procese anabolice, dintre care citäm sinteza bazelor purinice şi sinteza ureei.

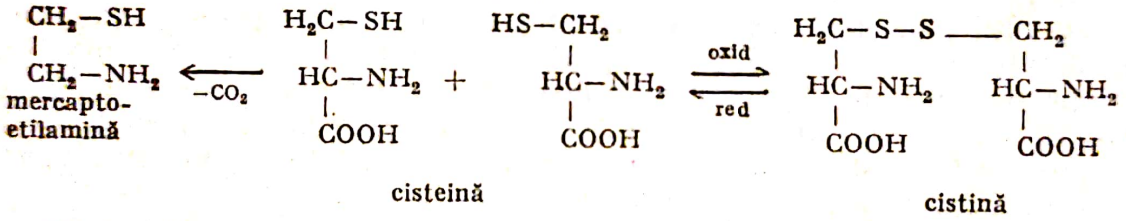
Asparagina, care se formează din acid aspartic şi amoniac, reprezintă un compus de detoxifiere asemănător glutaminei, fiind în acelaşi timp un component structural care intră în constituţia a numeroase proteine.

Scanned with OKEN Scanner

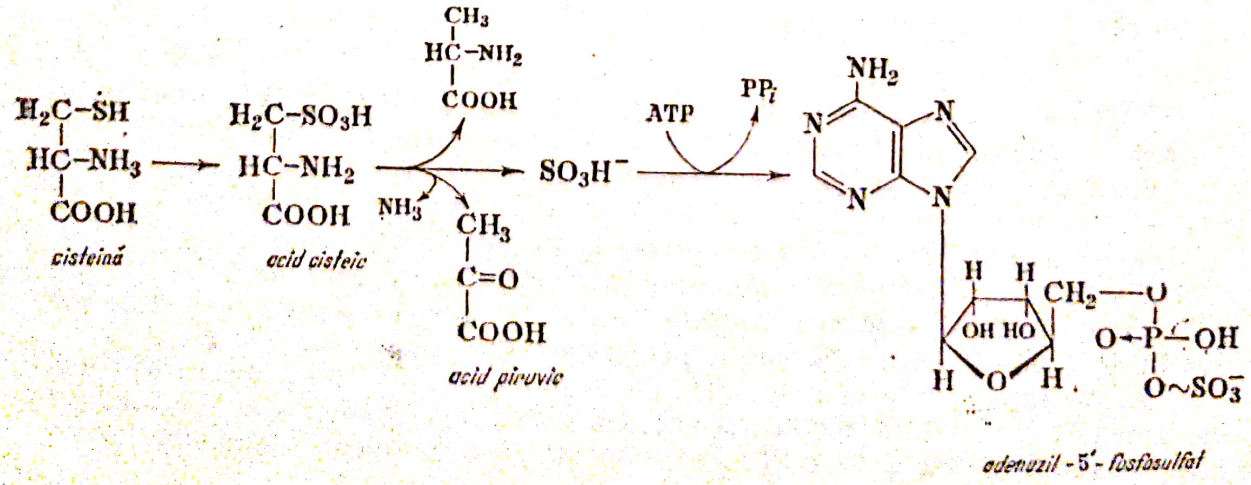
9.4.1.5. *Cisteina şi cistina* din organismele animale se sintetizează prin condensarea serinei cu metionina; ultimul fiind un aminoacid esenţial, formarea endogenă a cisteinei este parţial dependentă de aportul alimentar:



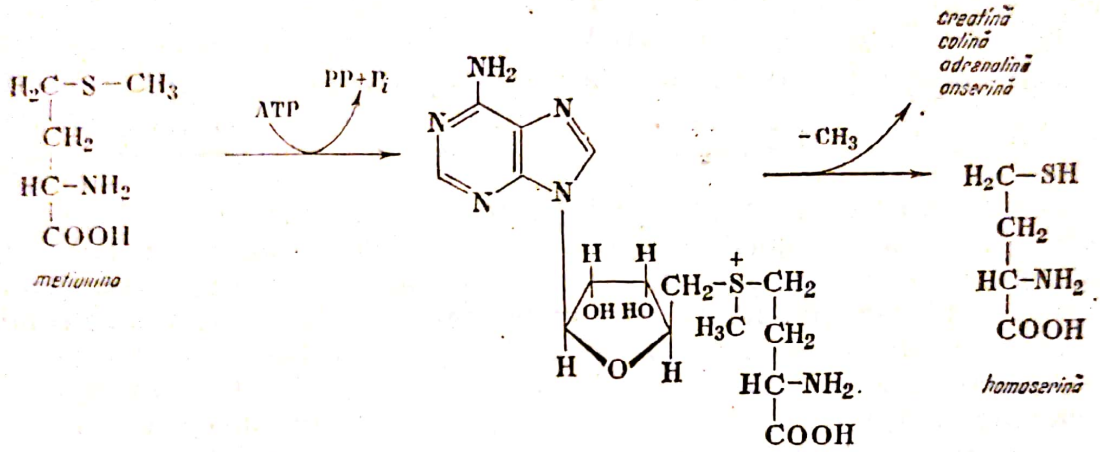
Printr-un mecanism de oxidoreducere, cisteina se poate transforma reversibil în cistină, proces ce are loc şi cu restul de cisteină din lanţurile polipeptidice, formîndu-se legăturile disulfurice ce stabilizează structurile terţiare ale proteinelor.



Dintre compuşii biologici activi care se formează avînd ca precursor cisteina, sînt de amintit: taurina, glutationul şi mercaptoetilamina, component al coenzimei A, format prin decarboxilarea cisteinei. Un proces important la care participă cisteina este sulfoconjugarea, în cursul căreia se detoxifică organismul de o serie de compuşi nocivi. Sulfatul activ, necesar acestui proces, se găseşte sub forma unui compus denumit *adenozin-5'-fosfosulfat* care ia naştere în cursul transformării cisteinei în acid piruvic sau alanină prin intermediul acidului cisteic. Formînd acid piruvic, cisteina este inclusă în categoria aminoacizilor glucogeni.



9.4.2.1. *Metionina* are în organism un rol major determinat de participarea sa la procesele de metilare. De fapt, în aceste procese nu participă metionina ca atare, ci un compus activat, *S-adenozilmetionină*. Prin cedarea grupării metil și îndepărtarea adenozinei se formează homocisteina. Dintre substanțele biologic active care iau naștere în urma unor reacții la care participă metionina activată, ca donatoare de grupări metil, citățm creatina, colina, adrenalina, anserina :



Metionina este un aminoacid glucogen, datorită faptului că se poate transforma în succinil-CoA.

9.4.2.2. *Treonina* este tot un aminoacid glucoformator, pentru că se poate metaboliza prin intermediul acidului piruvic ; nu sînt încă date suficiente în ceea ce privește alte transformări pe care le suferă în organismele animale.

9.4.2.3. *Valina, leucina și izoleucina* sînt aminoacizi cetogeni, mai ales leucina. Valina și izoleucina sînt în același timp și glucogeni, putînd genera acetil-CoA. Metabolizarea lor are loc în mod preferențial în sistemul nervos, din motive încă neprecizate.

9.4.2.4. *Arginina* este un aminoacid glucoformator, cu un rol important în ciclul ureogenetic, ca și în sinteza creatinei.

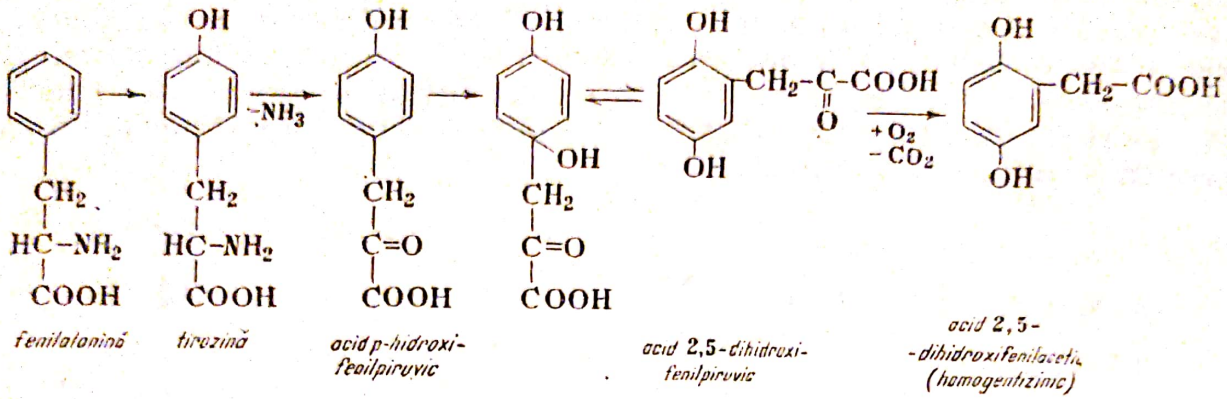
9.4.2.5. *Lizina*, aminoacid glucogen, se introduce în organismele animale prin alimentele de origine vegetală.

9.4.2.6. *Histidina* este un aminoacid glucogen, deoarece se poate transforma în acid glutamic ; histidina are o mare importanță pentru organism, intrînd în structura globinei, component al hemoglobinei, ca și în structurile celor două dipeptide localizate în țesutul muscular, carnozina și anserina ; prin decarboxilarea sa rezultă histamina, o amină biologic activă.

9.4.2.7. *Fenilalanina*, printr-un proces de hidroxilare ireversibil, formează *tirozina*. Ambii sînt aminoacizi atît gluco-, cît și cetogeni, deoarece se metabolizează prin intermediul acidului fumaric sau a acidului acetoacetic. Prin transaminarea tirozinei se formează acidul *p*-hidroxifenilpiruvic care, în condițiile lipsei enzimei care să-l metabolizeze, se acumulează în celule, provocînd o serie de efecte toxice deosebit de grave.

Scanned with OKEN Scanner

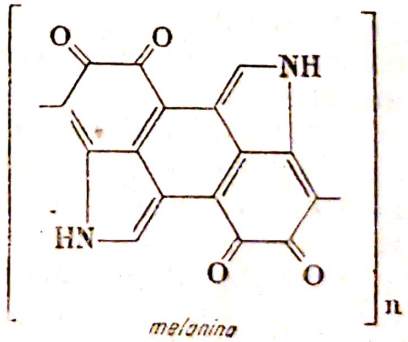
O altă afecțiune genetică se datorează imposibilității metabolizării acidului homogentizinic, și poartă numele de *alcaptonurie*. Acidul homogentizinic, care se poate metaboliza la acid acetoacetic, se formează prin următoarea secvență de reacții :

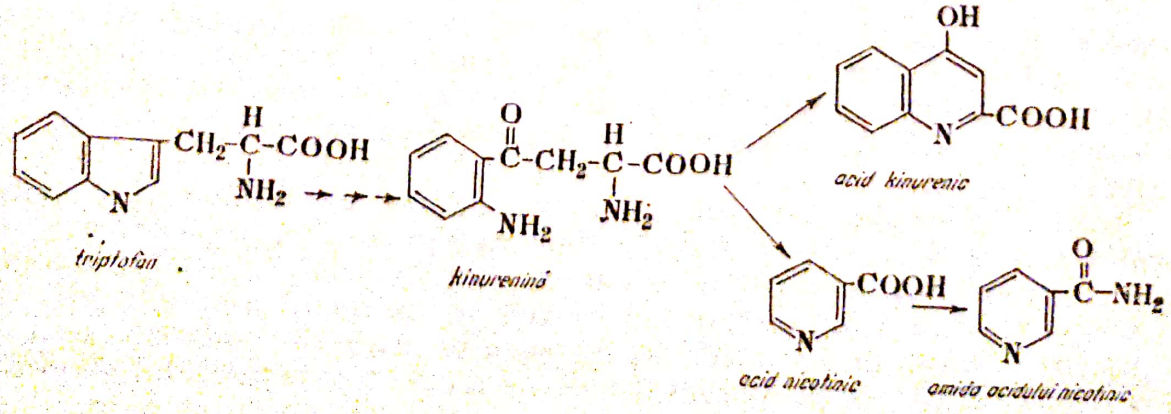


Cei doi aminoacizi participă la sinteza adrenalinei și noradrenalinei, hormoni secretați de modulosuprarenală. De asemenea, resturile de tirozină din structura unei proteine, tireoglobulina, se pot iodura, constituind punctul de plecare în sinteza unui alt hormon secretat de tiroidă, tiroxina (v. „Sisteme de autocontrol și reglare").

Fenilalanina și tirozina sînt și precursorii *melaninei*, un pigment de culoare închisă, ce se găsește sub forma unor combinații cu anumite proteine. Intermediar în sinteza melaninei este și DOPA. În condițiile deficienței enzimatice în sinteza melaninei pielea și părul rămîn decolorate, deficiența aceasta purtînd denumirea de *albinism*.

9.4.2.8. *Triptofanul* este un aminoacid glucoformator, metabolizîndu-se prin intermediul acetil-CoA. Catabolizarea sa implică un șir lung și complex de reacții, ca intermediar formîndu-se kinurenina, iar ca termeni finali acidul kinurenic, acidul antranilic și acidul nicotinic. Din acidul nicotinic se formează amida sa, vitamina PP ; această vitamină fiind un component al NAD^+ și $NADP^+$, se înțelege de ce în cazul unei alimentații deficitare în triptofan se poate instaura o afecțiune ce poartă numele de *pelagră* :





Prin decarboxilarea triptofanului se formează triptamina, iar a 5-hidroxitriptofanului, serotonina, compuşi biologici activi, vasoconstrictori şi hipertensivi (v. „Mecanisme de autocontrol şi reglare").

La nivelul intestinului gros, sub acţiunea microorganismelor din flora intestinală, din triptofan se formează indolul sau derivatul metilat al acestuia, scatolul.

În mod schematic se redau mai jos modalităţile de catabolizare ale aminoacizilor prin intermediul ciclului K r e b s. Se remarcă faptul că aproape toţi aminoacizii se pot metaboliza prin mai mulţi intermediari, ceea ce face să se înţeleagă de ce, de exemplu, leucina, fenilalanina, tirozina şi alţi aminoacizi, pot fi în acelaşi timp cetogeni şi glucogeni. Reiese, de asemenea, strînsa relaţie dintre metabolismul glucidic şi cel proteic, ambele avînd, la rîndul lor, interrelaţii cu metabolismul lipidic (fig. 60):

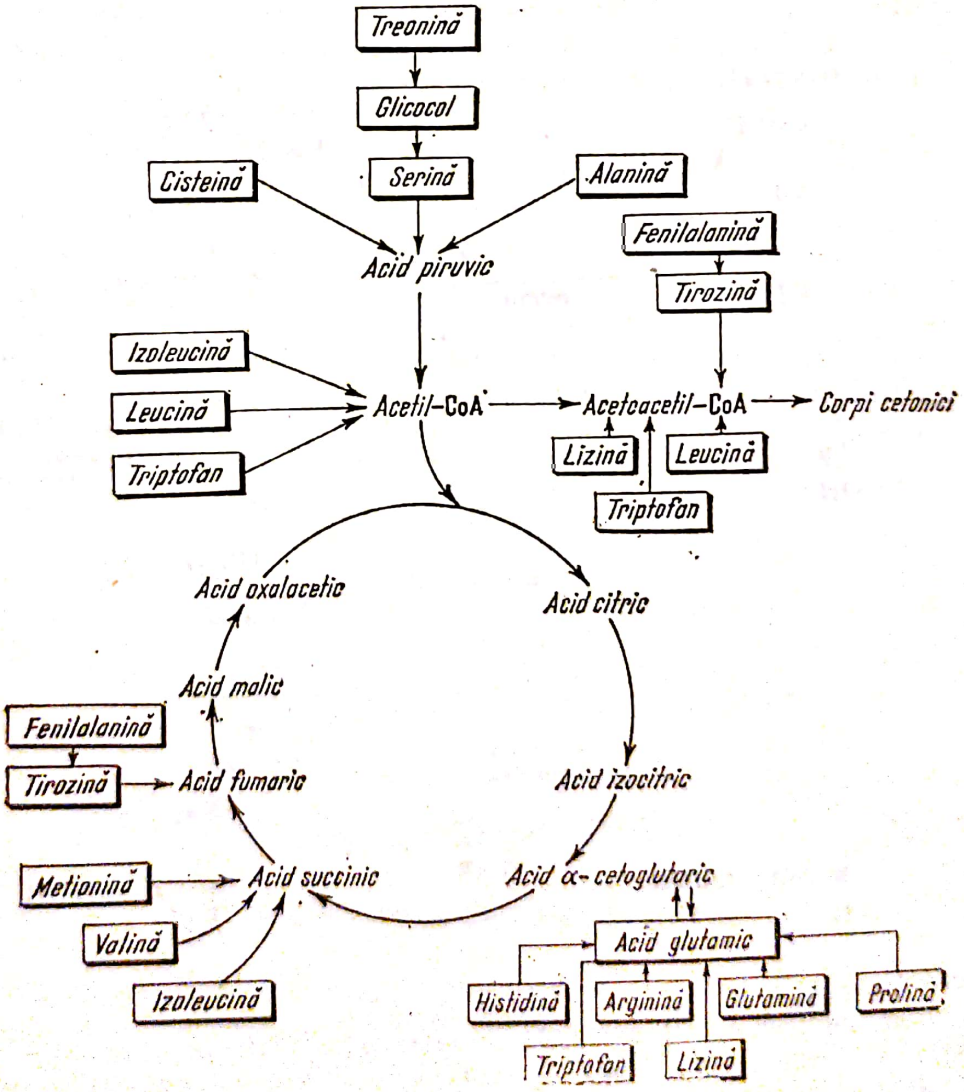
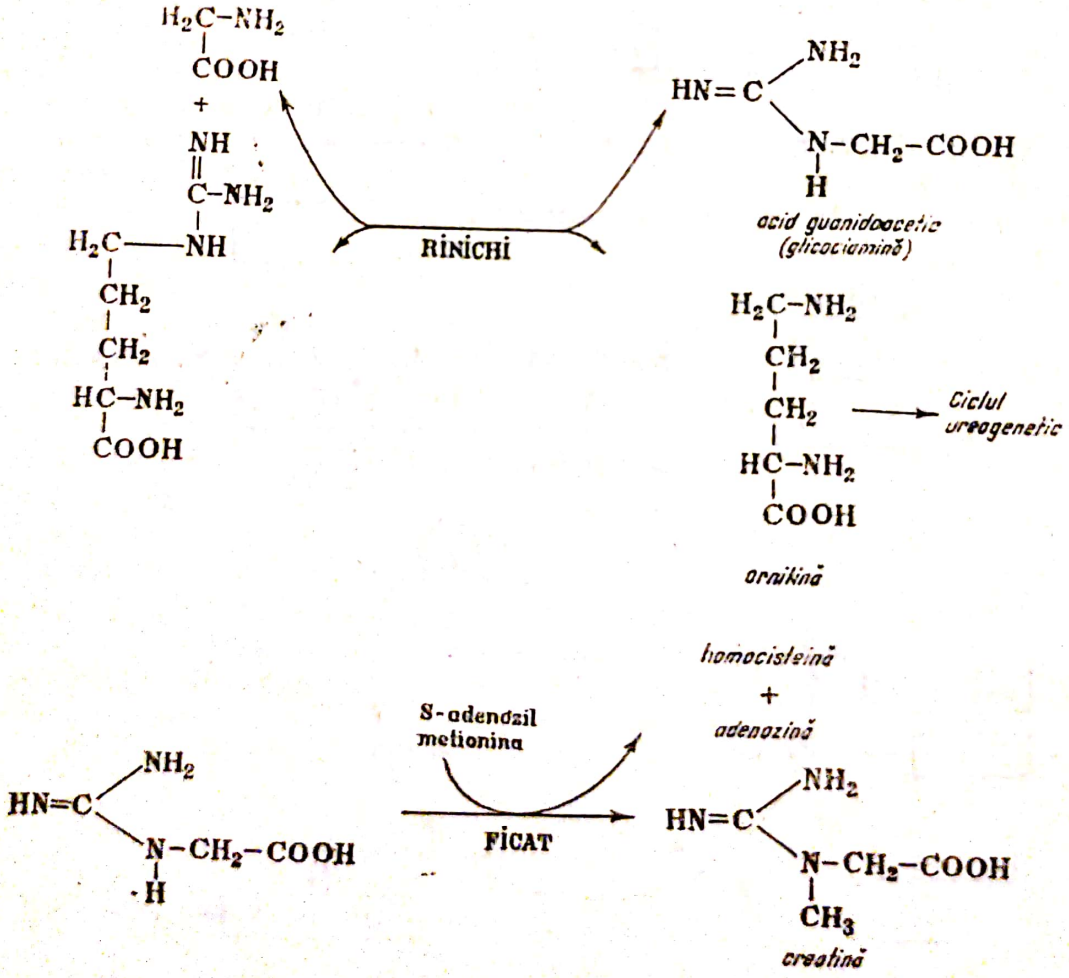


Fig. 60. Catabolizarea aminoacizilor prin intermediul ciclului K r e b s.

Scanned with OKEN Scanner

9.5. METABOLISMUL CREATINEI

Creatina este un compus azotat, total dependent de metabolismul proteic, la sinteza sa participînd drept precursori doi aminoacizi. Este un compus cu rol energetic de prim ordin la nivelul ţesutului muscular, deşi sinteza sa are loc în alte două organe, rinichi şi ficat. Se formează prin condensarea glicocolului cu arginina, printr-o serie de reacţii care se pot grupa în două etape : prima, avînd loc în rinichi şi într-o proporţie nesemnificativă în ficat, constă în condensarea glicocolului cu porţiunea guanidinică a argininei care se transformă în ornitină. Rezultă acidul guanidinacetic sau glicociamina, care este transportat pe calea sangvină pînă la ficat ; aici acidul guanidinacetic este metilat, în cea de a doua etapă, sub acţiunea S-adenozilmetioninei, luînd astfel naştere creatina. Din ficat, creatina ajunge, tot pe calea sangvină, la ţesutul muscular, unde se găseşte în echilibru cu forma sa fosforilată. Aceste etape succesive decurg conform reacţiilor :



Reacţia de fosforilare a creatinei este catalizată de o enzimă localizată strict în ţesutul muscular, denumită *creatinfosfokinază*. Reacţia este dependentă de intensitatea procesului de contracţie musculară, de concentraţia ATP, şi este corelată cu procesele generatoare de energie glico-

Scanned with OKEN Scanner

liza şi fosforilarea oxidativă. Reacţia este reversibilă şi decurge în modul următor :

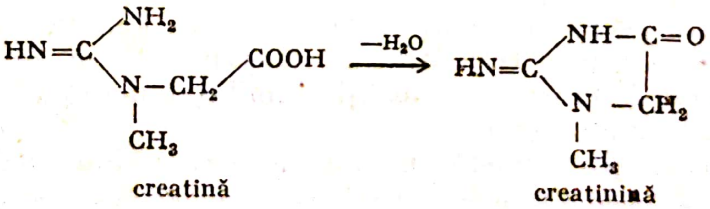
$$\text{Creatină} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{CP} + \text{ADP}$$

Creatinfosfatul este una dintre substanţele cu cel mai ridicat conţinut energetic din organism (v. „Compuşi macroergici"). Energia pe care o înmagazinează nu este utilizată direct în procesul contracţiei musculare, ci prin intermediul ATP. Prin urmare, CP este considerat drept un rezervor de grupări macroenergice a muşchilor. Aşa se explică de ce, în urma unor contracţii musculare de o intensitate moderată şi nu prea îndelungate, nu se pun în evidenţă modificări ale concentraţiei ATP, deşi procesul contracţiei musculare este strict dependent de energia eliberată din acesta. Refacerea ATP consumat în cursul contracţiei musculare este atît de rapidă încît practic este simultană cu scindarea sa. Refacerea ATP consumat are loc sub acţiunea conjugată a mai multor sisteme eficiente dintre care menţionăm glicoliza, fosforilarea oxidativă rezervorul pe care îl reprezintă CP, precum şi reacţia catalizată de miokinază, o altă enzimă specifică muşchiului, capabilă să refacă ATP din două molecule de ADP :

$$2\ \text{ADP} \overset{\text{miokinază}}{\rightleftharpoons} \text{ATP} + \text{AMP}$$

Dozarea CK serice se efectuează în mod curent şi în laboratoarele clinice, creşterea sa în ser avînd loc imediat după debutul unui infarct miocardic, ceea ce constituie o posibilitate de diagnostic rapid şi specific al acestei afecţiuni. De asemenea, CK poate oferi indicaţii preţioase în diverse afecţiuni musculare, ca de exemplu, distrofiile musculare.

Creatina se metabolizează prin transformarea sa în creatinină, compus ce ia naştere prin ciclizarea sa şi se elimină prin urină.



creatină creatinină

9.6. METABOLISMUL HETEROPROTEINELOR

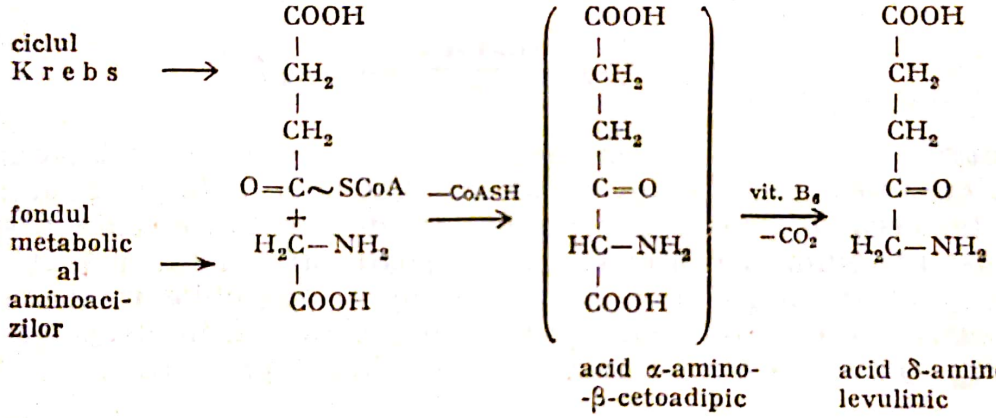
9.6.1. METABOLISMUL CROMOPROTEINELOR

Hemoglobina este cea mai importantă şi cea mai larg reprezentată cromoproteină din organismul uman. Metabolismul său subînţelege metabolismul celor trei componente distincte din care este alcătuită : partea proteică — globina — care reprezintă aproximativ 95% din totalul hemoglobinei, gruparea prostetică — protoporfirina IX — şi fierul. Există un raport riguros controlat între degradarea hemoglobinei şi durata vieţii

eritrocitului, astfel încît cele două procese nu pot să fie practic delimitate. În organismul unui bărbat de 70 kg, care conţine aproximativ 750 g hemoglobină, se sintetizează în medie pe zi 6,25 g, cantitate ce este perfect corelată cu numărul şi viaţa unui eritrocit de aproximativ 90—120 zile. Biosinteza hemoglobinei constă prin urmare în sinteza separată a grupării prostetice şi a porţiunii proteice, combinarea acestora avînd loc în final. Procesele de sinteză şi de degradare au loc în mai multe organe şi ţesuturi, ca: splina, ficatul, măduva osoasă etc.

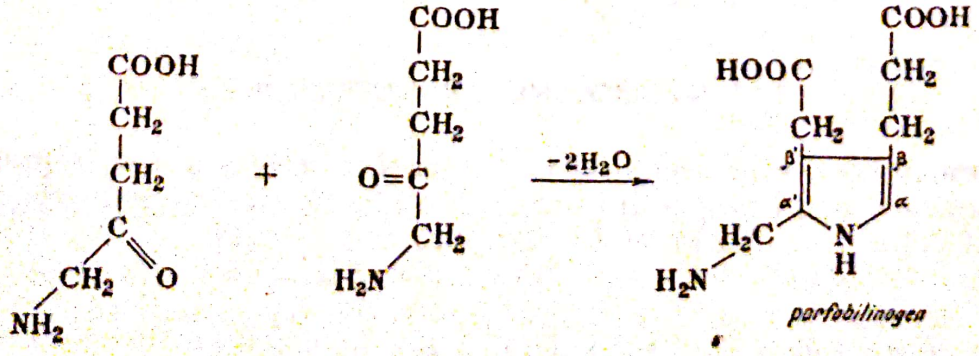
9.6.1.1. *Sinteza protoporfirinei IX* are loc în mitocondriile şi ulterior în reticulul endoplasmic al ficatului, fapt care poate fi explicat prin localizarea în mitocondrii a succinil-CoA precursor, împreună cu glicocolul, a porfirinelor. Detaliile întregului proces de sinteză au fost precizate, în urma cercetărilor efectuate cu glicocol şi succinil-CoA marcate cu atomi de carbon şi de azot radioactivi.

În prima etapă, catalizată de un complex enzimatic denumit *δ-aminolevulinicsintetaza*, glicocolul se condensează cu succinil-CoA formînd un compus instabil, acidul α-amino-β-cetoadipic; acesta este imediat decarboxilat sub acţiunea aceluiaşi complex enzimatic şi în prezenţa obligatorie a piridoxalfosfatului, formîndu-se acidul δ-aminolevulinic:

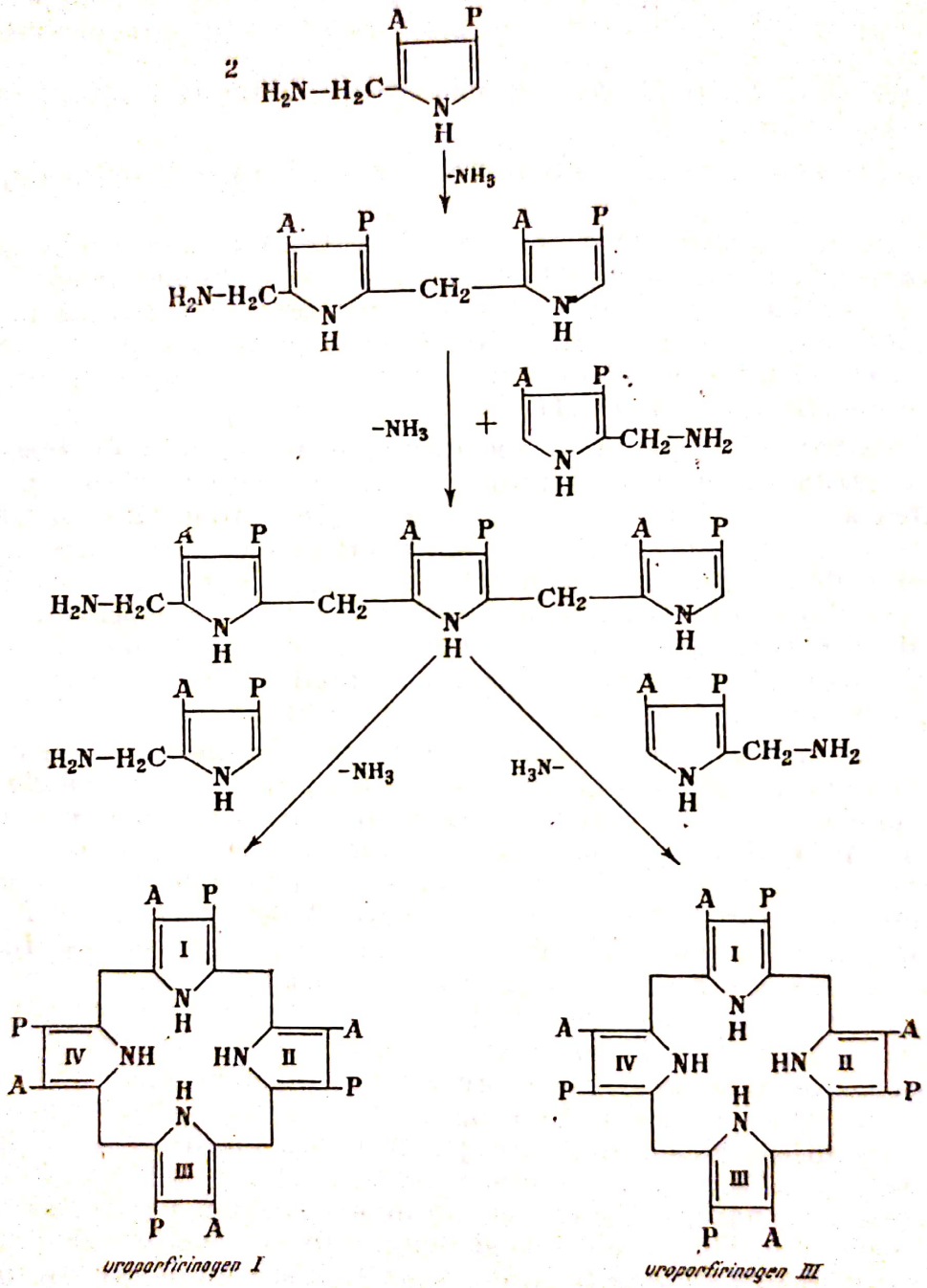


Activitatea δ-aminolevulinicsintetazei este sub un riguros control, fiind frînată de orice sinteză în exces a termenilor finali — hemul şi, în ultimă instanţă, hemoglobina însăşi: inhibiţia aceasta este evident de tip *feedback* (retroinhibiţie).

Etapa următoare constă în condensarea a două molecule de acid δ-aminolevulinic formîndu-se un derivat trisubstituit al pirolului, numit *porfobilinogen*. Sinteza se realizează sub acţiunea *porfobilinogensintetazei*, care este de asemenea enzimă cu rol de reglare:



Prin unirea treptată a porfobilinogenului se sintetizează compuși cu două, trei și în final cu patru cicluri pirolice legate între ele prin punți metilenice. *In vitro* asamblarea celor patru cicluri are loc numai în două



moduri din cele patru posibile (și realizabile în laborator) obținîndu-se, după închiderea sistemului, doi derivați porfirinici; diferența între cei doi derivați constă în faptul că la unul din ei cele patru cicluri pirolice sînt dispuse într-o ordine perfect simetrică, în timp ce la al doilea compus unul din cicluri este inversat.

Scanned with OKEN Scanner

Din primul precursor se vor sintetiza porfirinele numite de tip I, iar din cel de al doilea porfirinele de tip III. Ambele tipuri de porfirine iau deci naştere în mod normal în organism, dar cele de tip I se află pe de o parte într-o concentraţie extrem de mică, pe de altă parte, suita de reacţii care în cazul porfirinelor de tip III conduce la *protoporfirina* IX şi în continuare la hem, în cazul porfirinelor de tip I se opreşte la o anumită etapă.

Pentru simplificare în cele ce urmează se introduc următoarele notaţii ale radicalilor :

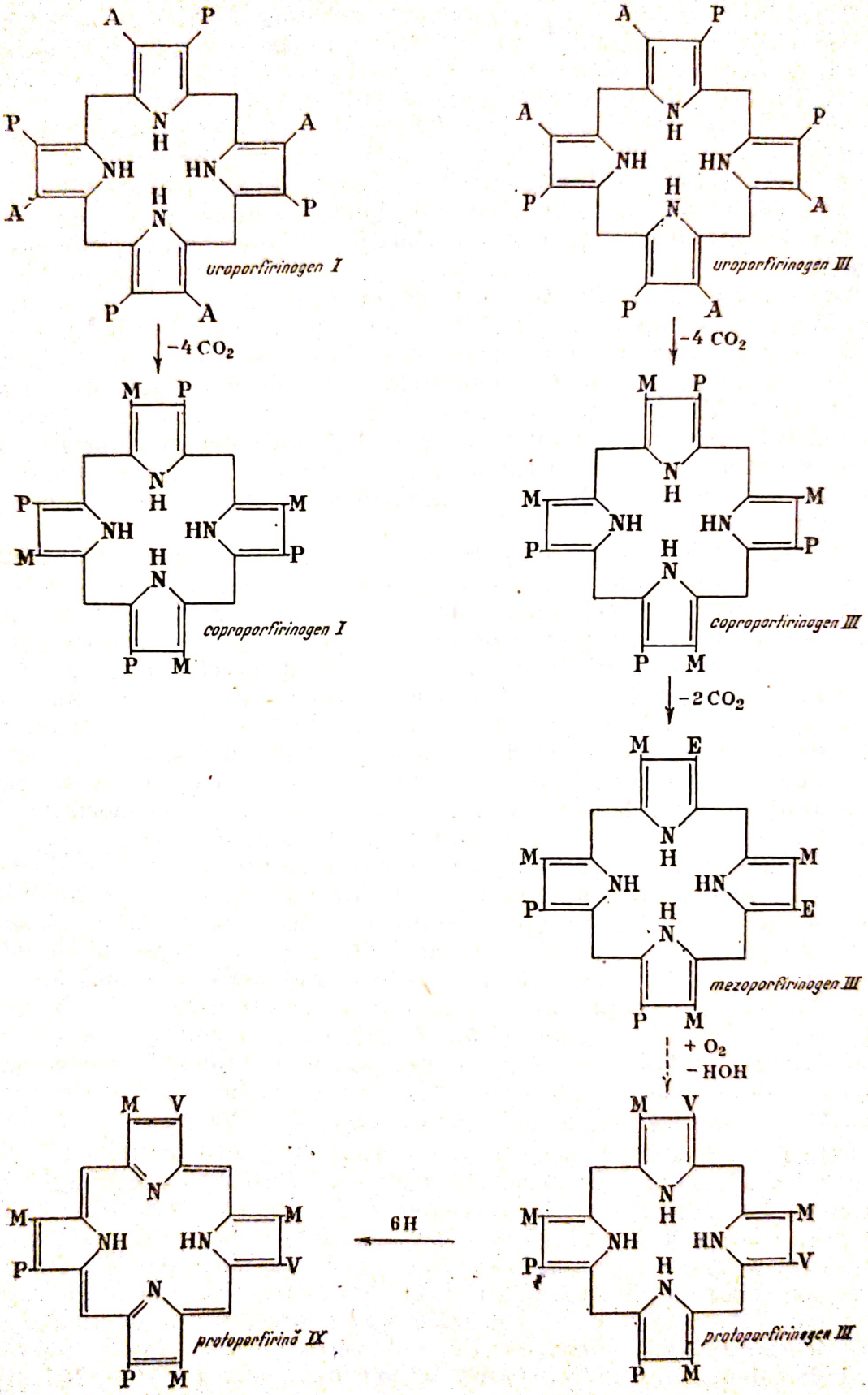
A : $-CH_2-COOH$; P : $-CH_2-CH_2-COOH$; V : $-CH=CH_2$; E : $-CH_2-CH_3$

În legătură cu inversarea celui de al patrulea nucleu pirolic pentru obţinerea uroporfirinogenului III s-au propus o serie de mecanisme, dintre care unul consideră că derivatul tripirilmetanic se scindează în două moduri obţinîndu-se doi dipirilmetani diferiţi (după poziţia în care are loc scindarea) şi pirol. Condensîndu-se între ei cei doi dipirilmetani conduc la uroporfirinogen I şi III.

Odată realizat sistemul uroporfirinic, printr-o suită de reacţii se asigură decarboxilarea tuturor radicalilor acetil, decarboxilarea şi dehidrogenarea a doi radicali propionil, precum şi dehidrogenarea sistemului tetrapirolic, ceea ce duce în final la protoporfirina IX dacă procesele au loc pornind de la uroporfirinogen III. Cu excepţia enzimei de decarboxilare a radicalilor acetil care acţionează atît asupra uroporfirinogenului III, cît şi uroporfirinogenului I, celelalte enzime nu catalizează reacţiile corespunzătoare ale uroporfirinogenului I produsul final obţinut fiind în acest caz coproporfirinogenul I (v. pag. 309).

De activitatea normală a enzimelor care catalizează toate etapele arătate depinde bunul mers al sintezei grupării prostetice a hemoglobinei. În urma unei deficienţe la nivelul uneia sau mai multora din aceste enzime apar tulburări care pot fi deosebit de grave ; ele se caracterizează prin acumularea în mod excesiv în urină sau fecale a unor porfirine, datorită imposibilităţii metabolizării lor în continuare. Aceste *porfirii* pot fi datorate unor factori genetici (de exemplu, la populaţii din Suedia şi Insulele Britanice, ca urmare a unui grad ridicat de consangvinitate), unor afecţiuni hepatice (ciroze, hepatite infecţioase, intoxicaţii cu mercur, plumb, arsen sau chimicale), unor afecţiuni la nivelul eritroblaştilor (leucemii, anemii pernicioase sau hemolitice) sau unor factori de diverse alte naturi. În fiecare din aceste tulburări, în urina sau fecalele bolnavilor cresc, uneori dominant, unul, alteori mai mulţi din porfirinogenii de tip I sau III, la care trebuie să mai adăugăm porfobilinogenul şi acidul δ-aminolevulinic. La lumină, uroporfirinogenii I şi III, şi coproporfirinogenii I şi III pierd cîte şase hidrogeni formînd compuşi cu sistemul dublelor legături identic celor din protoporfirina IX, numiţi uroporfirine I şi III, respectiv coproporfirine I şi III.

9.6.1.2. *Incorporarea fierului în protoporfirina IX* are loc la nivelul mitocondriilor din ficat sau a organelor hematoformatoare, dar şi în hematii (celule lipsite de mitocondri), sub acţiunea catalitică a *hemsintetazei*. Fierul provine din alimente sau din hemoglobina catabolizată. Fierul alimentar, care se găseşte de obicei sub formă de Fe^{3+}, este redus


uroporfirinogen I
uroporfirinogen III
$-4\ CO_2$
coproporfirinogen I
coproporfirinogen III
$-2\ CO_2$
mezoporfirinogen III
$+\ O_2$
$-\ HOH$
protoporfirinogen III
6H
protoporfirin IX

la Fe^{2+} ; absorbit la nivelul intestinului subțire și stocat în ficat sau splină sub formă de *apoferitină*, este transportat ulterior prin sînge sub forma unui complex fier-globulină serică numit *transferină*. De concentrația în sînge a fierului — care este în medie de 0,1 mg% — depinde într-o mare măsură intensitatea procesului de sinteză a hemoglobinei.

9.6.1.3. *Sinteza globinei*, partea proteică a hemoglobinei, se face la nivelul ribozomilor din eritroblaști și ficat ; ulterior sintezei are loc unirea celor două lanțuri α și două β cu patru molecule de hem, unirea făcîndu-se prin intermediul fierului și prin punți de hidrogen între gruparea aminică a lizinei din globină și gruparea carboxilică a radicalului propionic al hemului.

Întreg procesul de sinteză a hemoglobinei, în care se include și asamblarea celor trei componente — globina, protoporfirina IX și fierul — este riguros reglat, nefiind posibilă formarea sa în exces, fapt ce se realizează prin inhibarea produsă de termenii finali, protoporfirina IX, hemul sau globina însăși. Un alt inhibitor deosebit de eficient este *hemina*, care se formează prin oxidarea fierului din hem. Diferitele dereglări posibile ale sintezei componentelor constitutive, sau a asamblării lor, vor avea drept consecință imediată o scădere a concentrației hemoglobinei sub nevoile cerute de organism.

9.6.1.4. *Catabolismul hemoglobinei* este determinat și de viața unui eritrocit, în medie de 90—120 de zile. În această perioadă hemoglobina, dizolvată în interiorul celulei, nu suferă nici un fel de modificare, îndeplinindu-și rolul de transportor de oxigen. Odată cu îmbătrînirea eritrocitului încep și modificări discrete, structurale, la nivelul părții proteice. Prin urmare, procesul de catabolizare a hemoglobinei începe încă din interiorul hematiei ; dintre cele trei componente doar fierul va fi reutilizat în sinteza altor molecule de hemoglobină, globina și protoporfirina catabolizîndu-se ireversibil. Globina, sub acțiunea catepsinelor tisulare, este degradată pînă la aminoacizii constitutivi, iar protoporfirina se transformă în produși ce vor fi eliminați din organism.

Prin metabolizarea eritrocitului, proces care are loc la nivelul sistemului reticuloendotelial al splinei, nodulilor limfatici sau al ficatului, hemoglobina eliberată este preluată de o proteină prezentă în plasmă, denumită haptoglobină, cu o mare specificitate în formarea unui complex labil cu hemoglobina. Fierul bivalent al hemoglobinei se oxidează în complexul hemoglobină-haptoglobină, hemul transformîndu-se în hemină. Se pare că formarea *methemoglobinei* reprezintă o condiție obligatorie declanșării activității enzimelor de degradare. Complexul methemoglobină-haptoglobină se desface tot la nivelul țesuturilor menționate, unde, dealtfel, au loc toate celelalte etape de degradare (fig. 61).

Prima etapă a degradării constă în ruperea punții metilenice dintre ciclurile I și II, o oxigenază specifică catalizînd formarea unei grupări oxi și a uneia formil la acest nivel. Compusul intermediar care ia naștere și care mai păstrează legată globina se numește *verdoglobină*. Desfacerea ciclului tetrapirolic și procesele care urmează sînt incompatibile cu legarea în continuare a globinei și a fierului, acestea desfăcîndu-se în etapele ulterioare. Compusul care se formează are o culoare verde — de unde denumirea de *biliverdină* — și conține, în locul grupărilor oxi și formil, doi radicali hidroxilici. Prin hidrogenarea biliverdinei, sub acțiunea NADPH,

Scanned with OKEN Scanner

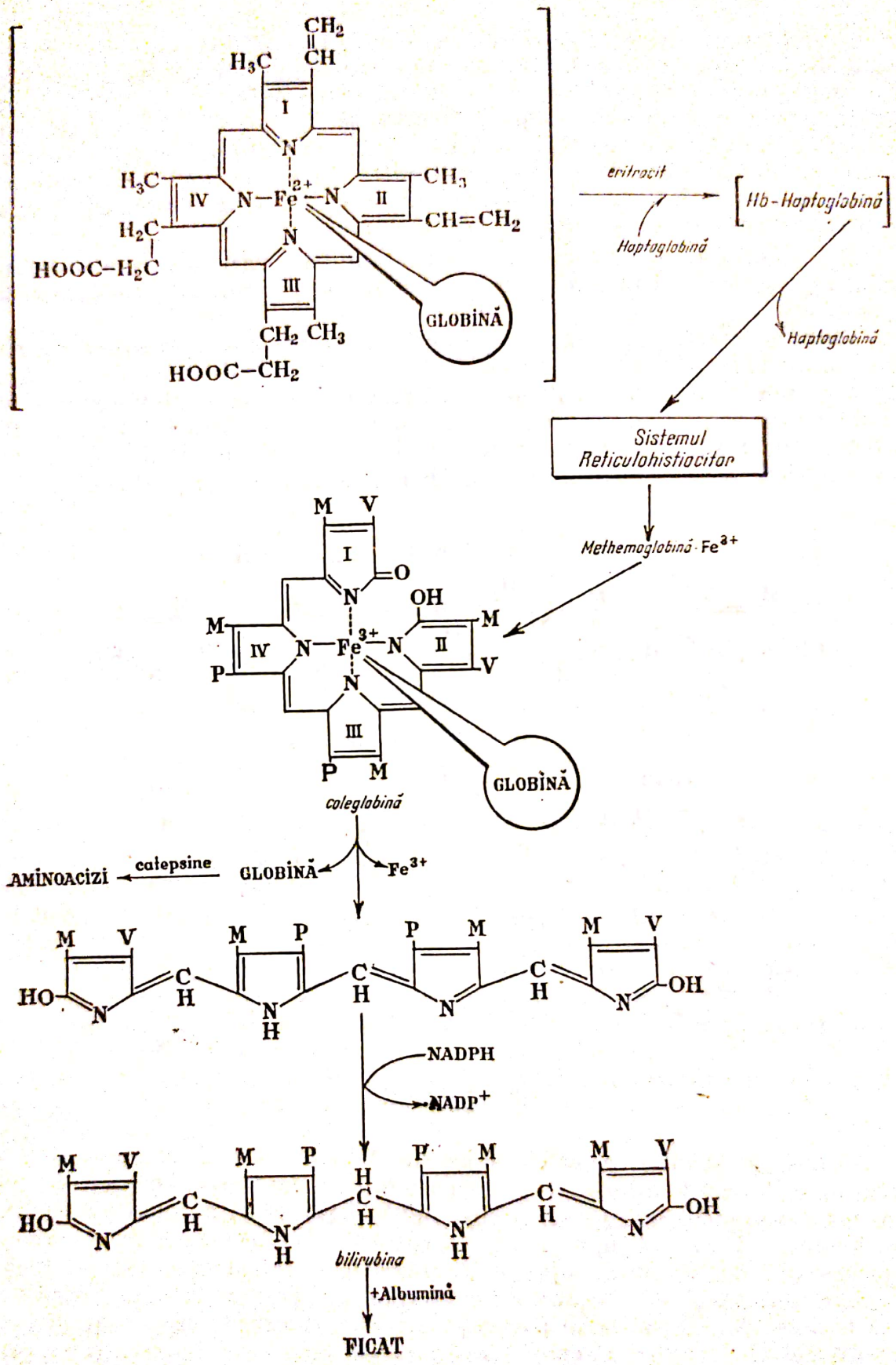


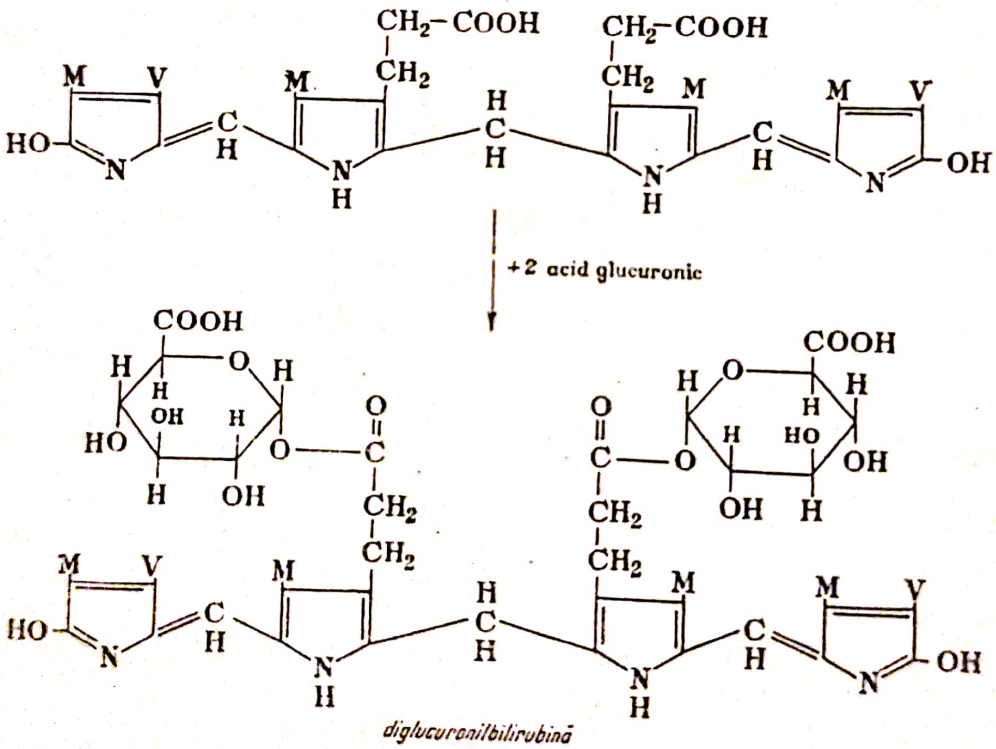
Fig. 61. Degradarea hemoglobinei la bilirubină.

Scanned with OKEN Scanner

la nivelul punții metilenice dintre ciclurile III și IV, se formează *bilirubina*. În urma acestui proces de reducere, culoarea compusului se schimbă din verde în roșu-brun. Bilirubina este transportată din sînge spre ficat, proces ce are loc imediat după formarea sa. Deoarece este un compus insolubil în apă, bilirubina se va lega labil cu albumina serică, devenind solubilă. Concentrația sa în sînge este între 0,1 și 0,7 mg%, cu toate că, zilnic, se formează în medie 250 mg bilirubină, aceasta demonstrînd capacitatea ridicată de detoxifiere a organismului.

Bilirubina, în urma legării sale cu albumina serică, este transportată prin sînge și reținută în ficat prin intermediul unor proteine citoplasmatice specifice.

Sub acțiunea unei enzime denumită *uridindifosfoglucuroniltransferază*, bilirubina se combină cu acidul glucuronic ce se leagă covalent la nivelul celor două grupări propionice, formîndu-se bilirubindiglucuronid. Enzima este localizată în reticulul endoplasmatic hepatic. Creșterea bilirubinei libere în serul copiilor nou-născuți se datorează și faptului că această enzimă se găsește la aceștia într-o cantitate mult redusă.

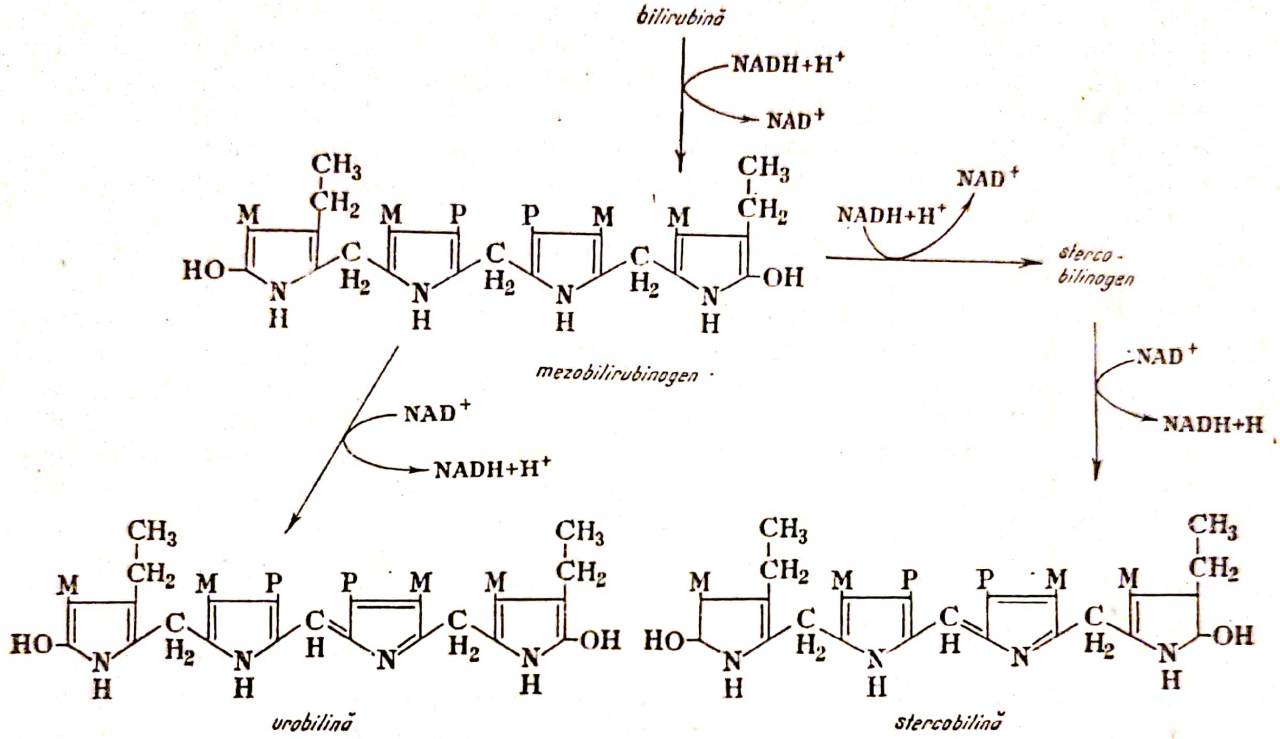


diglucuronilbilirubină

Proprietățile chimice și biologice ale bilirubinei conjugate cu acidul glucuronic sînt mult diferite de acelea ale bilirubinei libere. În primul rînd, în urma conjugării, bilirubina devine solubilă în apă și își pierde toxicitatea. Imediat după conjugarea sa, bilirubina este excretată prin celulele hepatice în bilă, de unde ajunge în intestin, nivel la care este redusă; în urma acestui proces se formează diverși compuși denumiți urobilinogeni, care se elimină, în mare parte, prin fecale. Aceste transformări reductive au loc sub acțiunea enzimelor pe care le conțin microorganismele din flora intestinală și încep prin desfacerea celor două molecule de acid

Scanned with OKEN Scanner

glucuronic, apoi bilirubina liberă este transformată în urobilinogen prin hidrogenarea sa la nivelul punţilor metilenice. Din urobilinogen se poate forma fie *urobilina*, fie *stercobilina*, compuşi care diferă prin gradul de saturare al celor patru cicluri pirolice:



O parte din bilirubina conjugată, cît şi din urobilinogeni, se reabsorb, constituind ciclul enterohepatic. Cantitatea de bilirubină conjugată reabsorbită este însă în mod normal nesemnificativă, aceasta deoarece pe de o parte se elimină relativ rapid prin fecale, pe de altă parte se reduce la urobilinogen. Un caz particular îl constituie nou-născuţii care, neposedînd încă floră intestinală, pot prezenta creşteri ale concentraţiei bilirubinei în sînge, aceasta neputîndu-se reduce în intestin pînă la urobilinogen. Prin obturarea canalului biliar printr-un calcul, se produce o creştere în sînge a bilirubinei conjugate, iar excreţia sa este încetinită. În condiţiile unui parenchim hepatic normal, practic tot urobilinogenul reabsorbit este fie eliminat prin urină, fie reţinut din nou de ficat, reeliminat prin bilă şi de aici prin fecale.

9.6.2. METABOLISMUL NUCLEOPROTEINELOR

Nucleoproteinele, biopolimeri de o maximă importanţă, au un metabolism complex, multe din sistemele enzimatice implicate avînd rol de reglare. Deşi prin alimente se introduc în organism cantităţi apreciabile de acizi nucleici, aceştia nu sînt utilizaţi ca atare. Mai mult, nu pot fi utilizate nici componentele lor constitutive, bazele purinice şi pirimidinice,

riboza, respectiv dezoxiriboza. În urma proceselor de digestie din intestin, acizii nucleici sînt desfăcuţi în nucleotide sub acţiunea *ribo-* şi *dezoxiribonucleazelor*, iar acestea sînt scindate în continuare sub acţiunea fosfatazelor pînă la stadiul de nucleozide, care, la rîndul lor, sînt hidrolizate de *nucleozidaze*, formîndu-se bazele azotate constitutive şi ozele respective. Ozele se absorb într-o cantitate limitată, în timp ce bazele azotate sînt degradate la nivelul intestinului şi eliminate. Doar o foarte mică parte din adenina acizilor nucleici alimentari a fost regăsită în acizii nucleici proprii. La nivelul intestinului are loc un proces activ de metabolizare a bazelor azotate, fiind identificate baze purinice marcate cu atomi proveniţi din cicluri pirimidinice. Nu se cunosc încă toate detaliile şi nici rolul acestor procese.

Din cele arătate mai sus rezultă că acizii nucleici, şi evident, componentele lor, bazele azotate şi ozele corespunzătoare (mai puţin acidul ortofosforic) se sintetizează endogen.

9.6.2.1. *Biosinteza nucleotidelor purinice* constituie un proces care a fost precizat în detaliu prin utilizarea compuşilor cu atomi marcaţi. S-a constatat astfel că la sinteza ciclului purinic participă un număr ridicat de precursori, şi anume glicocolul, glutamina, radicalul formil adus de THFA, CO_2 şi acidul aspartic. Integrarea porţiunilor cedate de aceşti precursori pentru formarea ciclului purinic este catalizată de numeroase enzime, atomii sau radicalii fiind introduşi într-o succesiune bine coordonată. Provenienţa atomilor de carbon şi de azot din ciclul purinic este redată mai jos (fig. 62) :

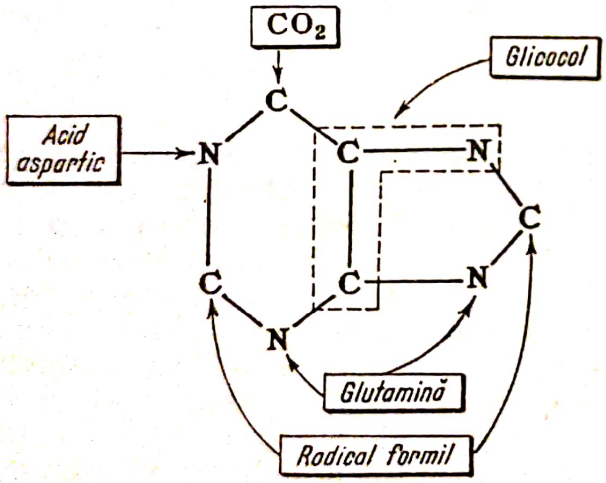
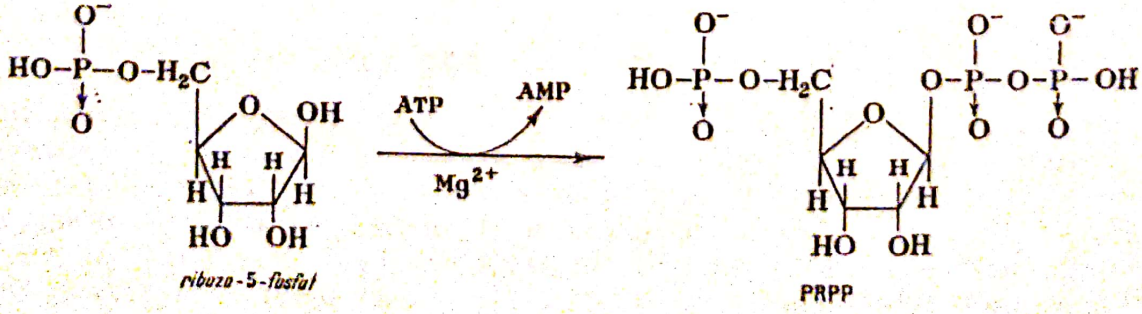


Fig. 62. Provenienţa atomilor din ciclul purinic.

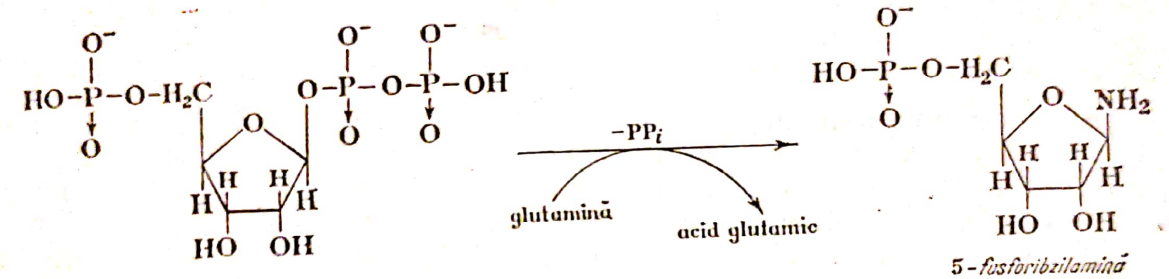
Procesul de biosinteză nu conduce la baze purinice, ci la nucleotizii corespunzători. Acest proces se desfăşoară în mai multe etape — majoritatea reacţiilor fiind ireversibile — şi are ca punct de pornire ribozo-5-fosfatul. Acest compus se formează endogen prin intermediul căii pentozofosfaţilor. Într-o primă etapă, sub acţiunea unei enzime ce necesită pentru activitatea sa ioni de magneziu, ribozo-5-fosfatul este fosforilat de către ATP la atomul de C_1. Se formează PRPP :

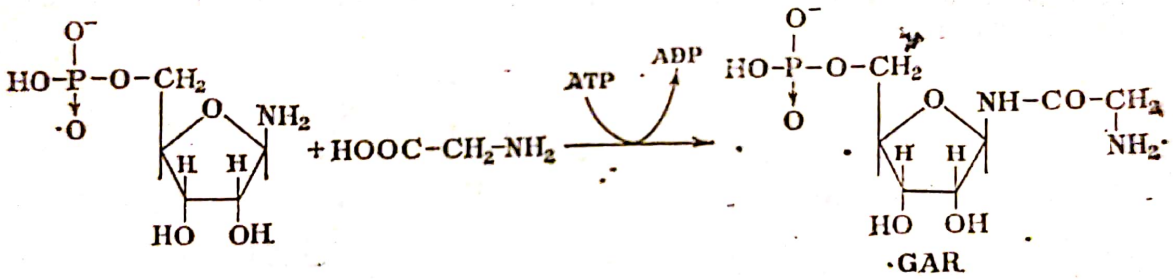


ribozo-5-fosfat PRPP

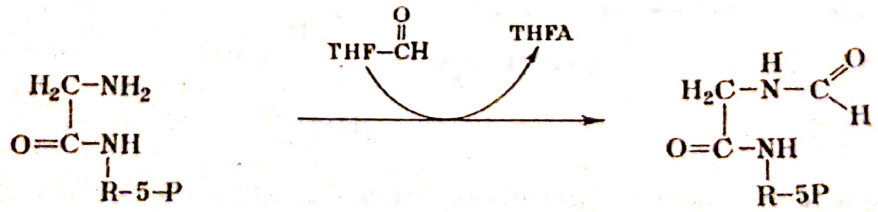
În următoarea etapă radicalul pirofosforil este înlocuit cu o grupare amino cedată de glutamină; acidul pirofosforic eliberat se hidrolizează la acid ortofosforic, eliberînd concomitent o cantitate de energie utilizată în reacţie (v. „Compuşi macroergici").

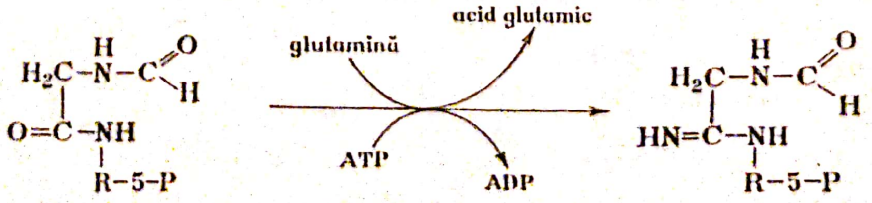
În cea de a treia etapă se introduc doi atomi de carbon şi unul de azot prin intermediul glicocolului; reacţia este endergonică, făcîndu-se deci cu consum de ATP. Se formează GAR :





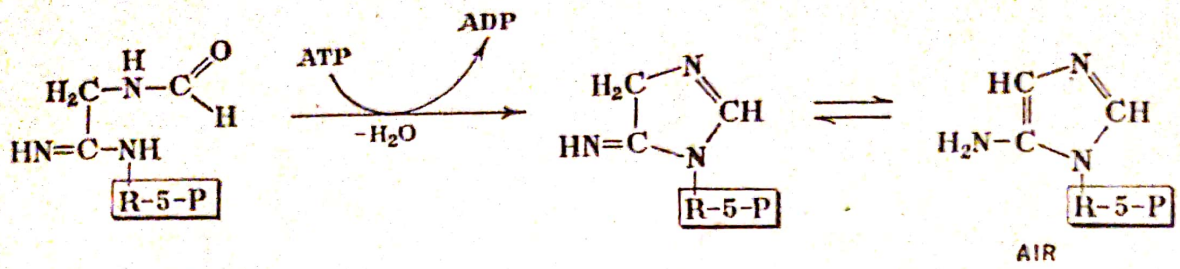
În continuare, se introduce un nou atom de carbon sub formă de radical formil, adus de acidul folinic, forma activată a THFA. Ia naştere FGAR, în structura căruia gruparea $\diagdown C=O$ este înlocuită cu grupa $=N-H$ prin intermediul glutaminei. În aceste reacţii radicalul 5-fosforibozil se înlocuieşte prin ribozo-5-fosfat.



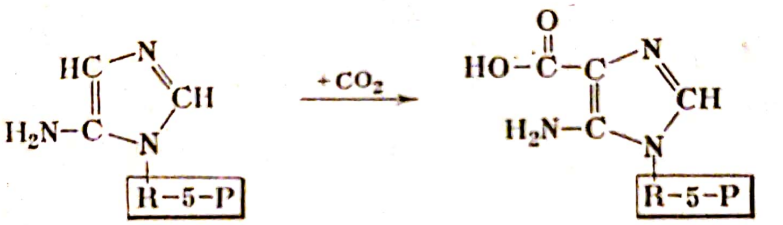


Prin eliminarea unei molecule de apă, FGAR se ciclizează luînd naştere ciclul imidazolic din nucleul purinic. Compusul format se numeşte

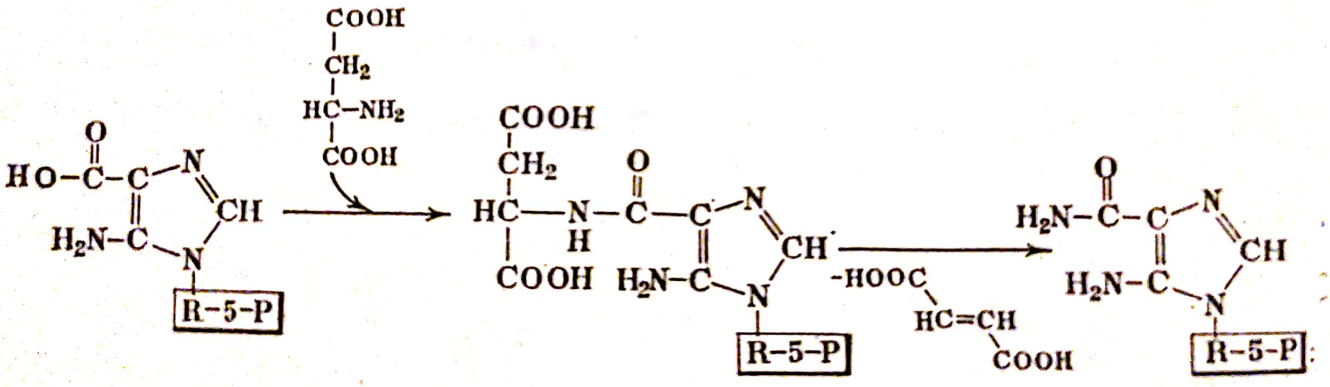
AIR, procesul necesitînd consumul unei noi molecule de ATP :



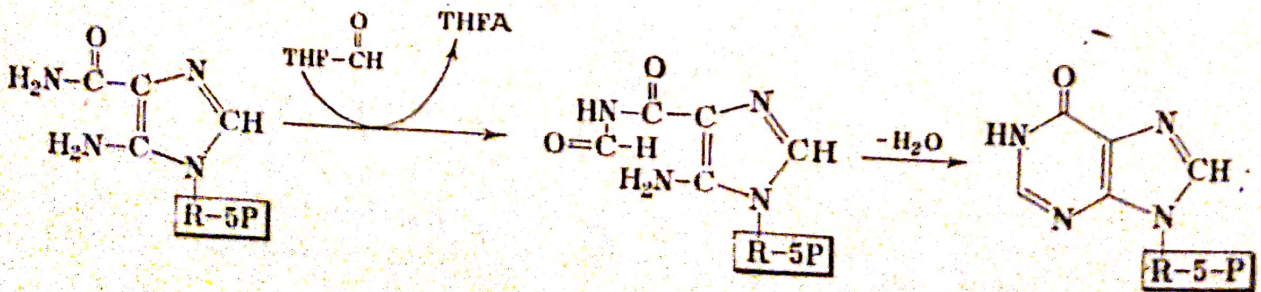
Din acest moment începe sinteza ciclului pirimidinic, prima fază a acesteia constînd în introducerea unei molecule de bioxid de carbon în AIR, formîndu-se acidul 5-aminoimidazolribonucleotid, compus care va prelua ulterior gruparea amino de la acidul aspartic. Acest ultim proces este similar cu cel întîlnit în ciclul ureogenetic ; acidul aspartic se transformă în acid fumaric care se metabolizează în continuare prin intermediul ciclului Krebs :



acidul-5-aminoimidazol-ribonucleotid



În etapa următoare se introduce un ultim atom de carbon (tot prin intermediul acidului folinic) și prin ciclizarea compusului format ia naștere primul derivat cu ciclu purinic, acidul inozinic :

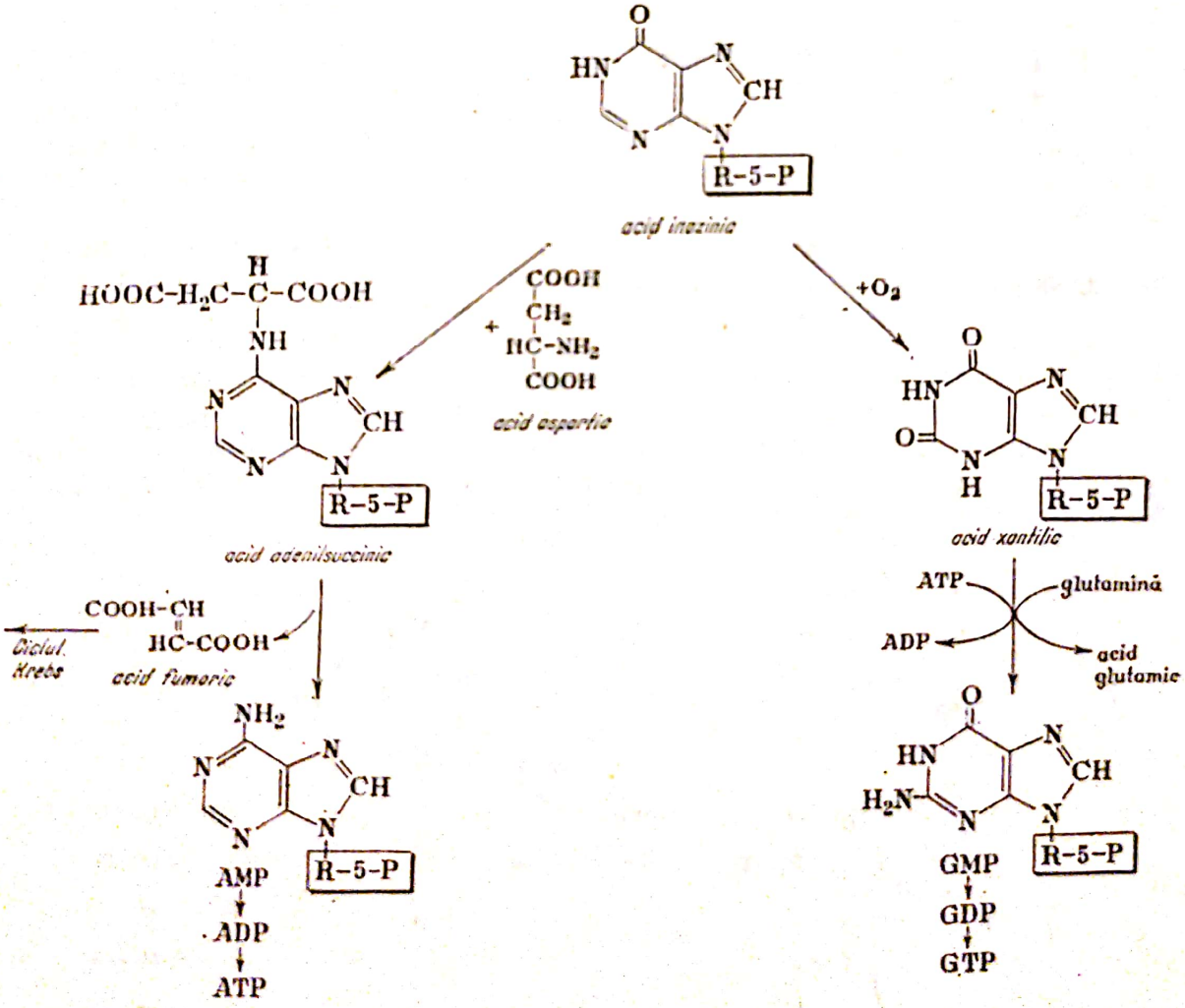


Pentru formarea ciclului inozinic este necesară, prin urmare, energia eliberată de 6 molecule de ATP, procesul fiind puternic enderogonic.

Procesul continuă, fiind posibilă sinteza celor două nucleotide purinice întîlnite în structura acizilor nucleici, și anume nucleotidele AMP și GMP. IMP reprezintă prin urmare un punct de ramificare și, așa după cum se știe, atît primele enzime ale unui ciclu, cît și cele din punctele de ramificare sînt enzime cu structuri alosterice și au deci un rol de reglare.

Sinteza AMP implică introducerea unei grupări amino în poziția 6 a acidului inozinic, furnizorul acestei grupări fiind acidul aspartic. Ca intermediar ia naștere acidul adenilosuccinic, prin desfacerea căruia se eliberează acid fumaric și AMP. AMP este fosforilat, formîndu-se succesiv ADP și ATP.

GMP se sintetizează trecînd prin faza intermediară de acid xantilic, ce ia naștere prin oxidarea acidului inozinic. Prin aminarea cu ajutorul glutaminei la atomul C_2 a acidului xantilic se formează GMP care, ulterior, prin fosforilări succesive, se transformă în GDP și GTP:



Dată fiind importanța biologică a compușilor nucleotidici, unități structurale ale unor biopolimeri de însemnătatea acizilor nucleici sau a unor coenzime, este normal ca sinteza și implicit concentrația lor să fie

reglate deosebit de riguros. Această reglare este posibilă datorită existenței enzimelor cu structură alosterică, situate în pozițiile-cheie ale procesului. Din schema de mai jos (fig. 63), rezultă că reglarea vitezelor de formare a adenozinfosfaților și guanozinfosfaților se realizează printr-un mecanism de tip *feed-back*, compușii înșiși frînînd sau accelerînd sinteza în funcție de necesitățile organismului. Astfel, pe de o parte toți termenii finali frînează activitatea enzimei ce acționează în prima etapă a procesului; pe de altă parte ATP este donorul de energie în sinteza GMP, iar GTP în sinteza AMP, aceste două substanțe activînd printr-un proces de *feedback* pozitiv căile respective. Prin urmare, dacă se formează mai mult GTP, acesta va intensifica producerea de adenozinfosfați, și invers, ATP va intensifica sinteza guanozinfosfaților. Așa se explică de ce nu se pot produce acumulări de baze purinice. Evident, reglarea activităților enzimelor din întreg procesul descris este controlată și de alte componente sau efectori alosterici, în ansamblu procesul de reglare fiind mult mai complex.

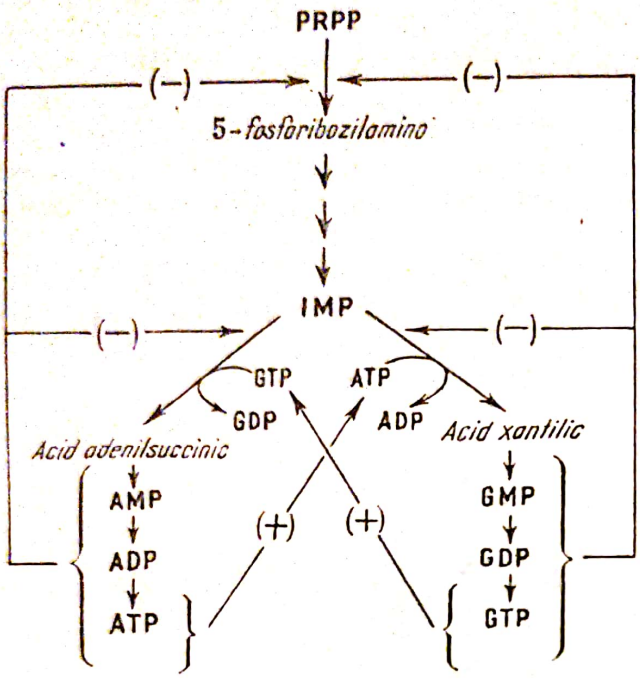
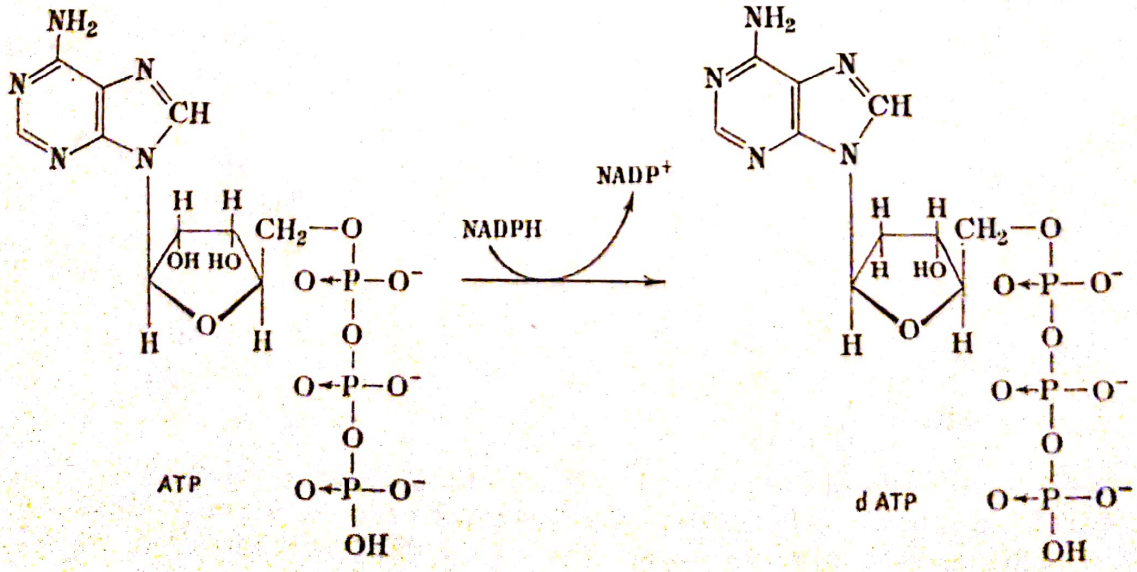


Fig. 63. Mecanismul de autoreglare în biosinteza nucleotidelor purinice.

Sinteza dezoxipurinnucleotidelor respective are loc prin reducerea ribonucleotizilor corespunzători, pornindu-se deci de la ATP și GTP. Agentul reducător este o enzimă cu NADPH:



9.6.2.2. *Biosinteza nucleotidelor pirimidinice* se deosebeşte de procesele de biosinteză a nucleotidelor purinice, iar principala diferenţă constă în faptul că în acest caz, ribozo-5-fosfatul se ataşează după încheierea sintezei ciclului pirimidinic. A doua deosebire majoră constă în faptul că sinteza ciclului pirimidinic are ca precursori doar două componente, şi anume acidul aspartic şi carbamilfosfatul (fig. 64) :

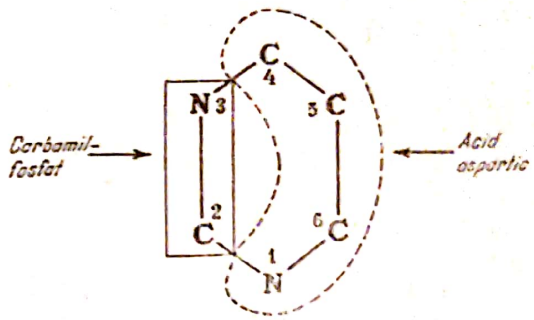
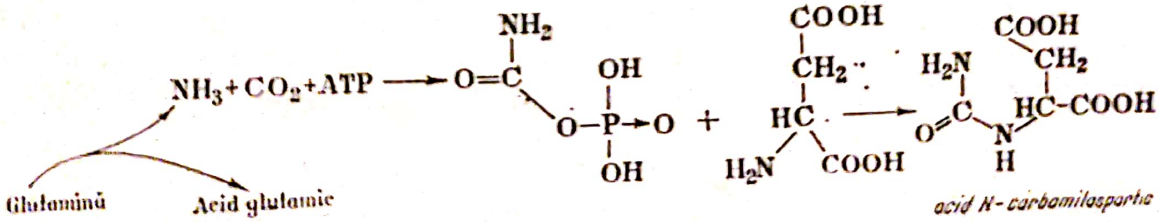


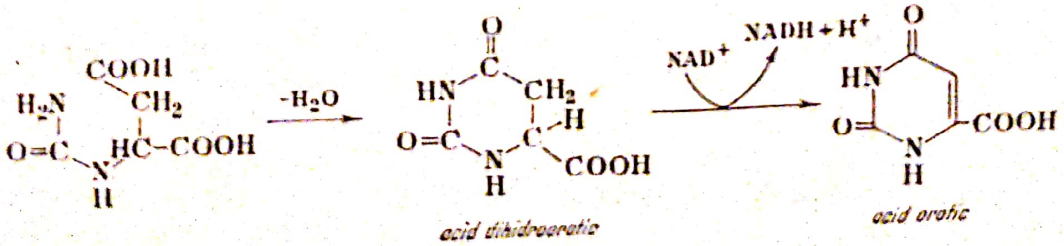
Fig. 64. Proveniența atomilor din ciclul pirimidinic.

Formarea carbamilfosfatului necesar acestui proces are loc în urma unor reacţii care diferă oarecum de cele descrise în cadrul ciclului ureogenetic. Astfel, procesul nu se desfăşoară în mitocondrii, ci în citoplasmă, enzimele participante au caracteristici distincte, iar amoniacul ce participă în reacţii nu derivă din dezaminarea acidului glutamic, ci din glutamină. Enzimele participante în acest proces sînt specifice bazelor pirimidinice, se găsesc într-o cantitate mică, activitatea lor fiind însă proporţională cu necesităţile sintezei. O altă caracteristică importantă o constituie faptul că, spre deosebire de formarea carbamilfosfatului mitocondrial, cel citoplasmatic este inhibat de concentraţii crescute de UTP, compus care este de fapt unul din termenii finali ai procesului.

Detaliile procesului au fost elucidate tot cu ajutorul izotopilor radioactivi.

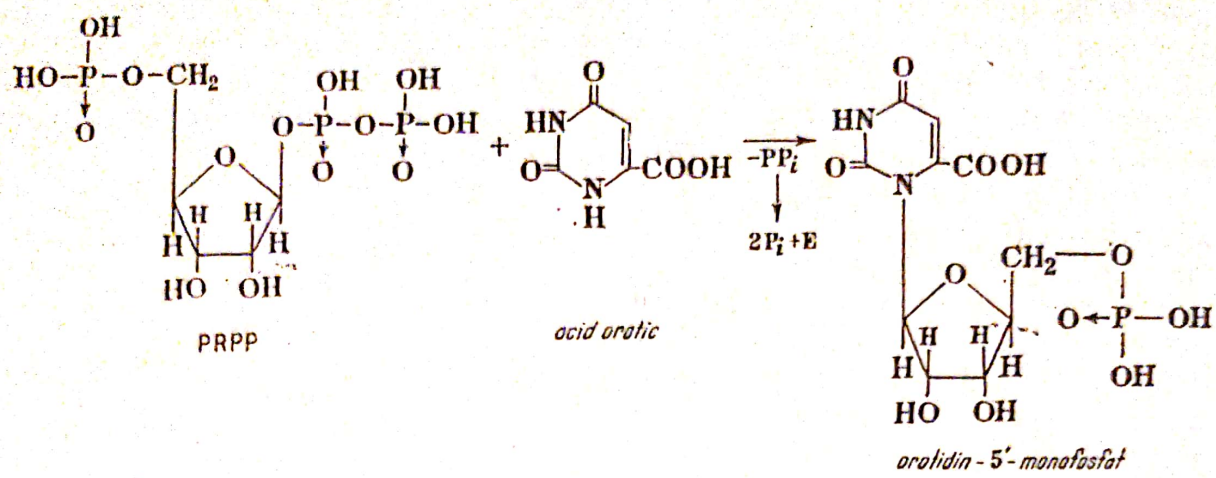
Carbamilfosfatul se condensează cu acidul aspartic, formîndu-se acidul N-carbamilaspartic. Acesta, prin pierderea unei molecule de apă se ciclizează, dînd naştere primului compus cu ciclu pirimidinic, acidul dihidroorotic; prin dehidrogenarea acestuia din urmă se formează acidul orotic :



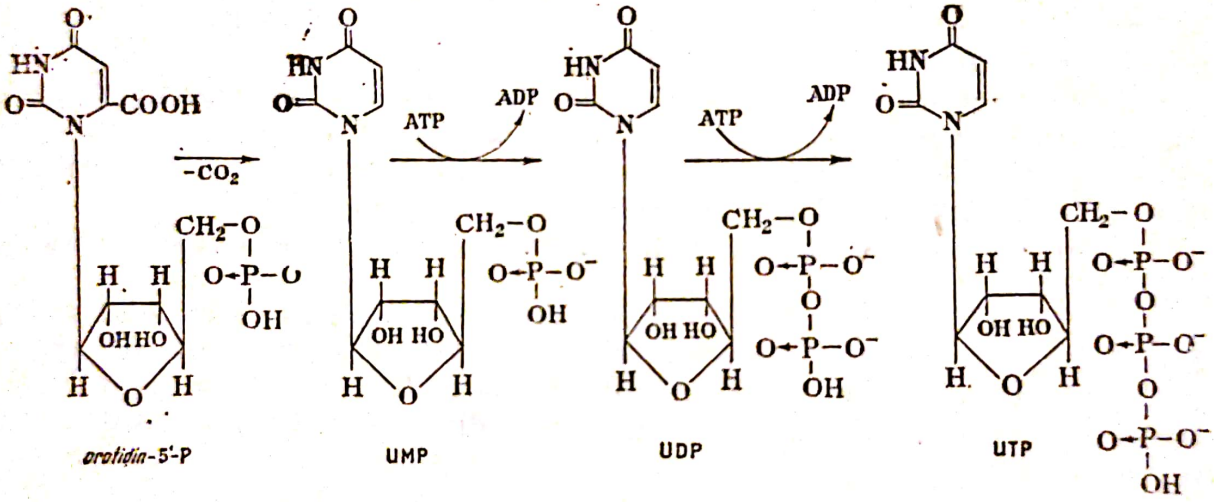


Acceptînd o moleculă de ribozo-5-fosfat, acidul orotic se transformă în orotidin-5'-fosfat. Pentru această sinteză este necesară prezenţa PRPP ;

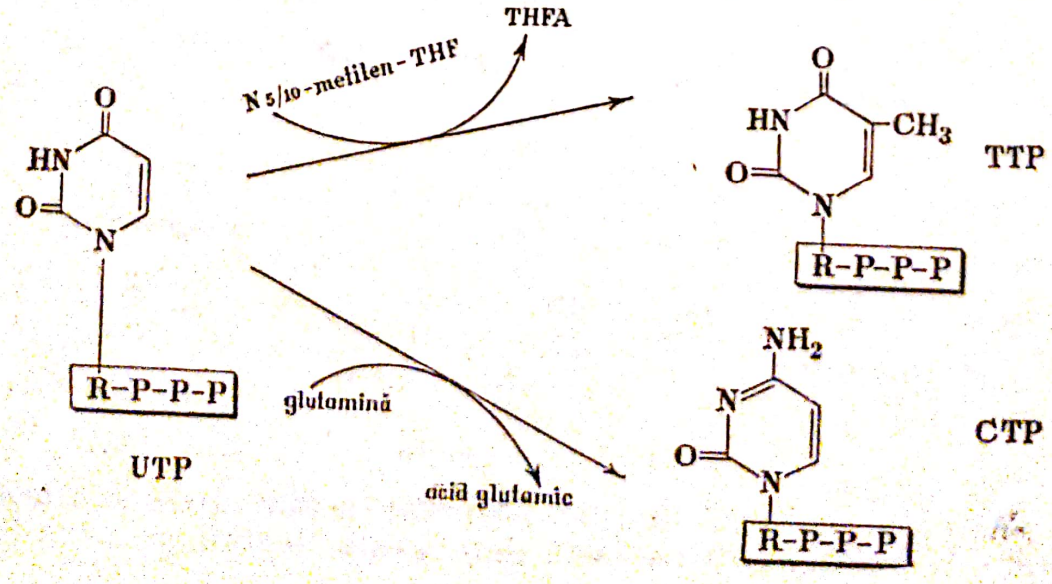
și în acest caz, prin hidroliza acidului pirofosforic se eliberează energie :



Prin decarboxilare, orotidin-5'-fosfatul formează primul nucleotid pirimidinic—UMP—care, ulterior, se fosforilează prin intermediul ATP, sintetizîndu-se UDP și apoi UTP :



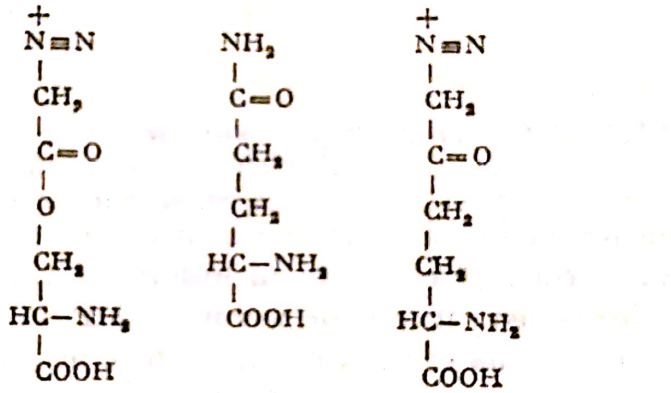
Din UTP se pot forma și celelalte două nucleotide pirimidinice, GTP și TTP, primul în urma aminării produse sub acțiunea glutaminei, al doilea printr-un proces de metilare care are loc în prezența acidului folinic :



Reglarea întregului proces este realizată și în acest caz de produșii finali care pot inhiba prima etapă a reacțiilor.

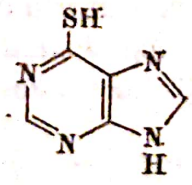
Ca și în cazul nucleotidelor purinice, derivații corespunzători care au dezoxiriboză în loc de riboză se formează prin reducerea ribozei din structura nucleotidelor respective. Procesul necesită, pe lîngă un donator de hidrogen (NADPH) și o proteină specifică, *tioredoxina*, care poate ceda și accepta în mod reversibil atomi de hidrogen la nivelul a două resturi de cisteină din structura sa. Procesul este incomplet conturat, dar se știe că necesită un sistem enzimatic complex.

9.6.2.3. *Inhibitorii sintezei nucleotidelor* sînt substanțe care împiedecă sinteza nucleotidelor, implicit a ADN și ARN. Ele se utilizează în cazurile în care celulele se multiplică și se dezvoltă în mod anarhic, ca de exemplu în cancer. Aceste substanțe cu efect inhibitor au, în marea lor majoritate, o analogie structurală cu diverși intermediari sau componente care participă direct în procesul de biosinteză. Astfel are loc un proces de inhibiție competitivă la nivelul enzimelor ce acționează în etapele respective. Așa sînt, de exemplu, azaserina și 6-diazo-5-oxonorleucina care au analogii structurale cu glutamina:

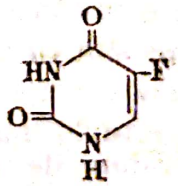


azaserină — glutamină — 6-diazo-5-oxonorleucina

Alți inhibitori, din mulți sintetizați și utilizați astăzi în chimioterapia cancerului, sînt 6-mercaptopurina și 5-fluorouracilul:



6-*mercaptopurină*



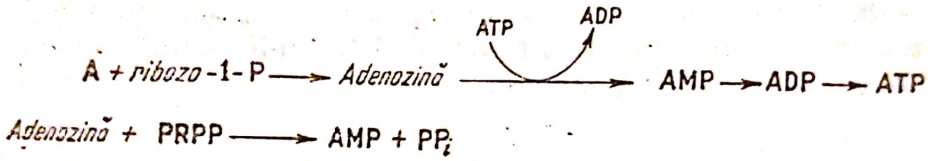
5-*fluorouracil*

9.6.2.4. *Catabolismul nucleotidelor* asigură, similar fondului metabolic al aminoacizilor, un fond comun al nucleotidelor prin care se menține un echilibru între procesele de sinteză și de degradare, precum și în ceea ce privește necesitățile metabolice ale organismelor, nucleotidele avînd numeroase alte roluri în afară de acela de a fi precursori ai acizilor nucleici.

Nucleotidele sînt hidrolizate iniţial de către nucleotidaze (*fosfomonoesteraze*) care desfac acidul sau acizii ortofosforici cu formarea nucleozidului respectiv, desfăcut în continuare de nucleozidaze în cele două componente constitutive, baza azotată şi oza :

Nucleotid → P_i
↓
Nucleozid
↙ ↘
Bază azotată Oză

Degradarea bazelor purinice şi pirimidinice se face pe căi diferite. O parte din bazele azotate eliberate prin catabolizarea nucleotidelor nu este degradată, ci reutilizată, intrînd în aşa-numita cale de „salvare". Se pot forma astfel atît nucleozide, cît şi nucleotide. Adenozina şi guanozina pot lua naştere prin reacţia dintre adenină, respectiv guanină cu ribozo-1-fosfatul, iar AMP şi GMP prin condensarea bazelor libere cu PRPP. Enzimele care catalizează aceste reacţii sînt deosebit de active în creier şi mai puţin în ficat :



9.6.2.4.1. *Catabolismul bazelor purinice.* Cele două baze purinice, adenina şi guanina, au acelaşi termen final catabolic, acidul uric. În ceea ce priveşte adenozinnucleotidele, acestea sînt metabolizate prin două variante : în prima variantă AMP este mai întîi dezaminat, formîndu-se acidul inozinic, care, pierzînd acidul fosforic şi ulterior riboza, se transformă în hipoxantină ; în cea de a doua, AMP se transformă în adenozină şi apoi în adenină care, la rîndul ei, prin dezaminare, se transformă tot în hipoxantină. Prima variantă este calea cea mai utilizată în organismele umane, enzima care transformă adenina în hipoxantină fiind *adenaza*. Hipoxantina se oxidează pînă la xantină, derivat în care se transformă şi GMP după defosforilarea şi îndepărtarea ribozei ; *guanaza*, enzima ce dezamineză guanina, are o intensă activitate în ficat. Hipoxantina este oxidată la xantină şi în continuare la acid uric cu ajutorul oxigenului molecular. Ambele etape sînt catalizate de către aceeaşi enzimă, *xantinoxidaza*, ce necesită pentru activitate FAD, ioni Mo^{6+} şi Fe^{3+} neheminic. Enzima este localizată în citoplasma ficatului.

Întreaga succesiune de reacţii este redată mai jos, săgeţile mai îngroşate indicînd calea principală de catabolizare (fig. 65).

În cursul acestor procese se eliberează o cantitate însemnată din amoniacul total produs în organism, care este însă imediat neutralizat prin modalităţile descrise — formarea de glutamină sau de uree.

Acidul uric format este rapid eliminat din ficat prin sînge, ajungînd la rinichi, de unde este apoi excretat prin urină. Acidul uric poate fi parţial disociat la nivelul celor trei grupări hidroxilice, dar în urinele acide

Scanned with OKEN Scanner

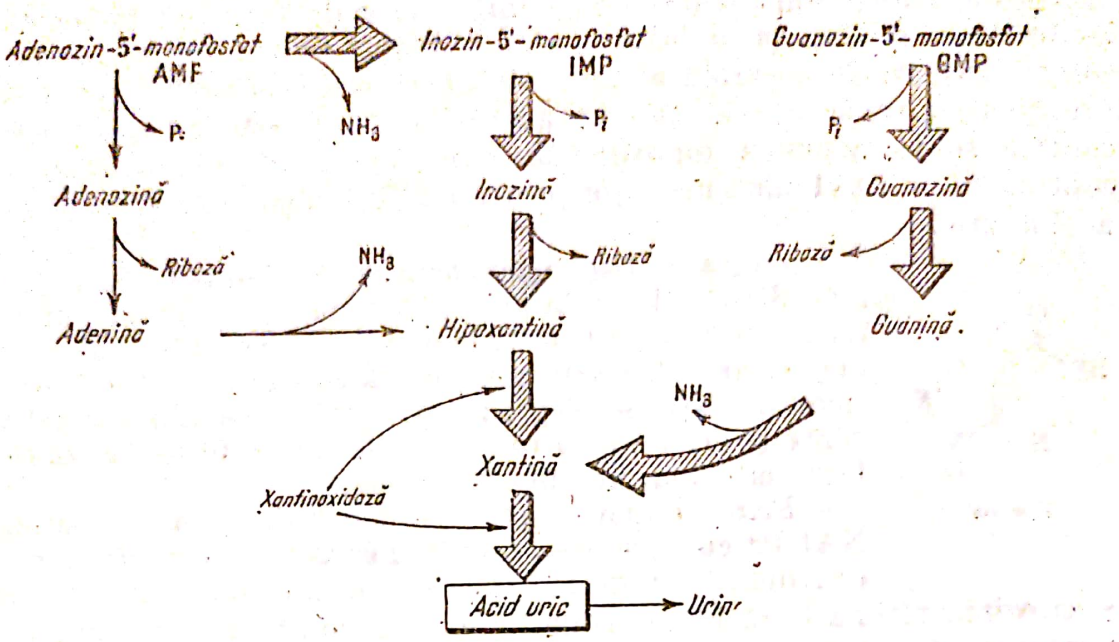
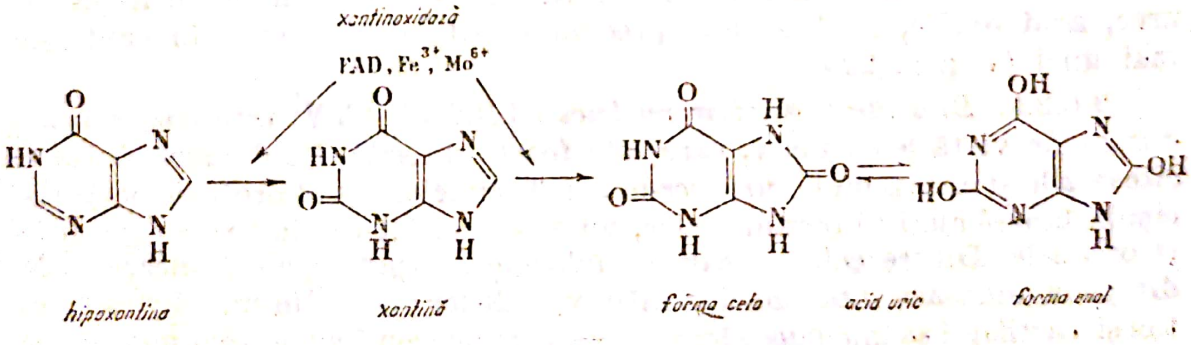


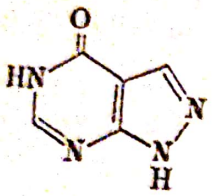
Fig. 65. Degradarea bazelor purinice.

se găsește sub formă nedisociată, puțin solubilă, putînd deci să precipite. Precipitarea nu are însă loc în mod obișnuit, ci numai în condițiile în care și alte componente se află în exces, de exemplu ionii de Ca^{2+} cu care coprecipită. În consecință se pot forma, cu încetul, calculi de acid uric care sînt secundari calculilor de oxalați sau fosfați de calciu :



Cantitatea de acid uric ce se elimină prin urină nu reprezintă un indice fidel al catabolizării bazelor purinice, deoarece o parte din acidul uric trece din ficat în bilă și de aici în intestin, unde este catabolizat de către microorganismele florei intestinale. Proporția de acid uric care poate fi astfel metabolizată se ridică pînă la 20—50% din totalul acidului uric. Chiar și în aceste condiții însă, dozarea acidului uric în laboratoarele clinice poate constitui un parametru util. Valorile normale ale acidului uric sintetizat pe zi se înscriu între 3—6 mg ; concentrația serică a acidului uric este mică —60 μg/ml ser — limita de solubilitate a uraților de sodiu fiind de aproximativ 15 ori mai mare decît aceasta. Totuși, în anumite condiții, acidul uric precipită la nivelul încheieturilor producînd inflamații dureroase. O concentrație cronică crescută a acidului uric în sînge și urină este carac-

teristică unei afecțiuni denumită *gută*, inflamațiile de la nivelul încheieturilor numindu-se tofi. Și în cazul acestei afecțiuni se pot utiliza inhibitori competitivi, ca de exemplu alopurinolul, care pot bloca activitatea xantinoxidazei; structural aceștia se aseamănă cu hipoxantina. În aceste condiții se va acumula hipoxantina, care, neputîndu-se metaboliza în continuare, se va elimina mai ușor prin urină fiind mult mai solubilă decît acidul uric.



alopurinol

9.6.2.4.2. *Degradarea bazelor pirimidinice.* Acest proces este diferit de acela al bazelor purinice. Termenul final nu mai este acidul uric, ci o serie de derivați ai unor compuși carbamilici sau care derivă din aceștia. Pirimidinnucleotidfosfații se degradează după o prealabilă defosforilare și desfacere a ozei, deci se pornește de la bazele libere, citozina, uracilul și timina.

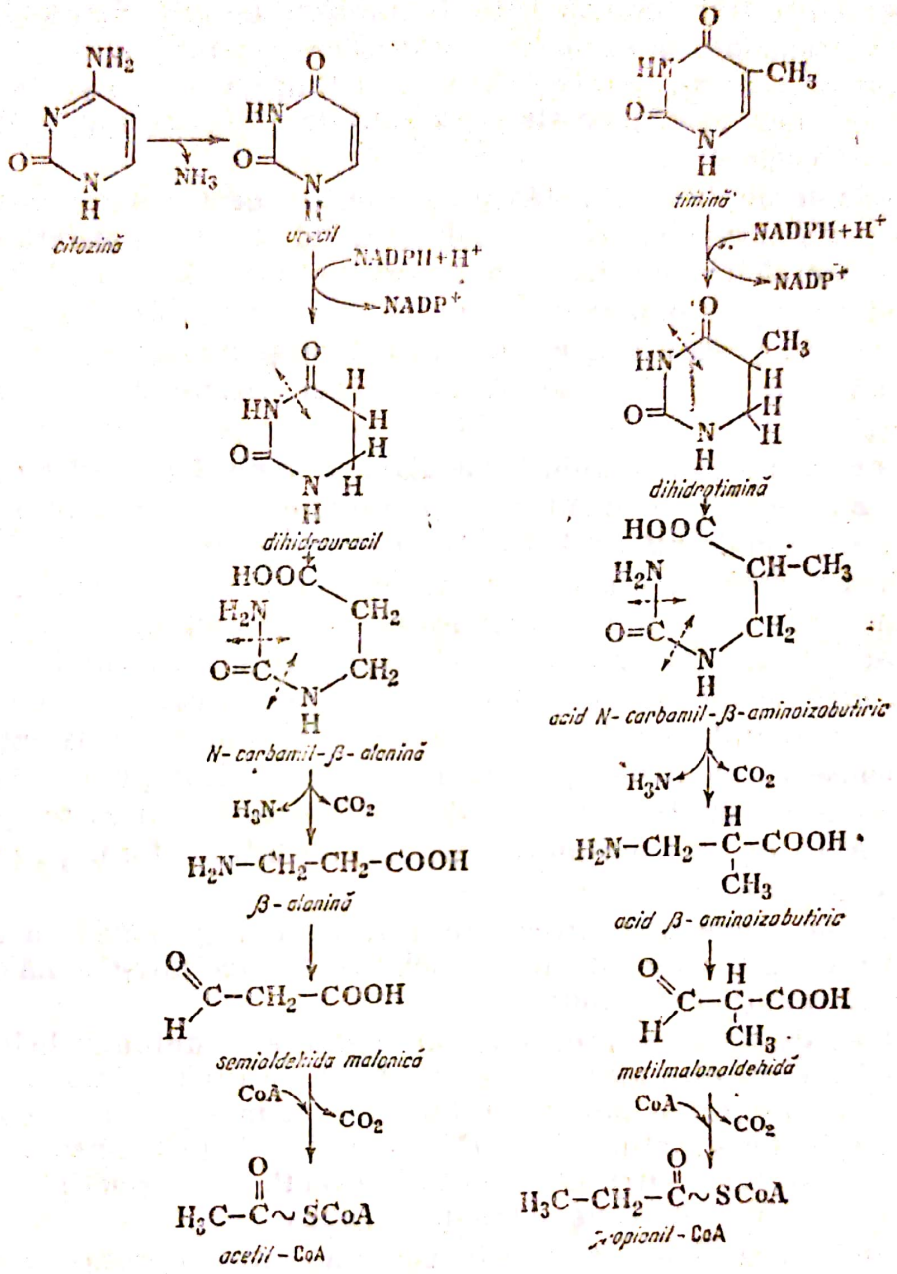
Prima etapă constă într-o dehidrogenare produsă de $NADP^+$ cu formarea dihidroderivaților respectivi, proces continuat prin desfacerea ciclului pirimidinic. Din uracil și citozină, ultima bază transformîndu-se prin dezaminare în uracil, se formează N-carbamil-β-alanina, iar din timină acidul N-carbamil-β-aminoizobutiric. Acești ultimi doi derivați se metabolizează în continuare prin mai multe etape, termenii finali fiind acetil-CoA și propionil-CoA. Acetil-CoA și propionil-CoA sînt metabolizați în continuare prin căile cunoscute.

În cursul acestui proces catabolic se formează și uree, fie din amoniacul eliberat în cursul reacțiilor, fie ca atare, prin metabolizarea bazelor pirimidinice, printr-o serie de căi particulare ce pot genera, în afară de uree, acid oxalic, acid formic, precum și alte componente în cantități mai mici (v. pag. 225).

9.6.2.5. *Biosinteza acizilor nucleici* (*ADN și ARN*) este corelată cu durata de viață a celulelor, care este foarte diferită, fiind cuprinsă între cîteva zile și cîteva luni; *turnover*-ul acizilor nucleici și al proteinelor, principalii biopolimeri ai organismelor, nu este deci identic în toate țesuturile și organele. Dintre celulele care se înlocuiesc rapid se menționează cele din piele, mucoasa intestinală și măduva oaselor; cele din mușchii scheletici și cartilagii se înlocuiesc lent, în timp ce neuronii nu se mai pot reface în timpul vieții. Există apoi celule specializate în sinteza unor compuși cu structură proteică — proces dependent de ARN — ca, de exemplu, celule din mucoasa intestinală, pancreas, ficat etc. care sintetizează enzime proteolitice, albumină etc. Sinteza proteinelor și, în ultimă instanță, formarea celulelor sînt deci dependente de ADN și ARN, ceea ce justifică afirmația că de procesele de biosinteză ale acestor biopolimeri depinde bunul mers al întregului organism.

ADN fiind metabolic stabil, biosinteza sa va consta în reformarea continuă în celulele noi a tipului de ADN din celulele vechi, printr-un proces de replicare (duplicare). Spre deosebire de ADN, ARN este un polimer mult mai puțin stabil, iar catabolizarea sa decurge pînă la compo-

Scanned with OKEN Scanner



nentele constitutive; aceasta înseamnă că procesul de sinteză a ARN este foarte intens, acest proces depinzînd total de ADN.

Ca material genetic al cromozomilor, ADN are asigurată stabilitatea metabolică prin posibilitatea desfacerii dublului helix în cele două lanțuri polinucleotidice, fiecare dintre ele constituind matricea (modelul) după care se sintetizează lanțurile polinucleotidice noi. Copierea exactă, fără greșeli, a lanțului ADN este strict obligatorie, deoarece secvența bazelor azotate din ADN se va reflecta în secvența specifică a aminoacizilor în toate proteinele organismului nostru, implicit în enzime. Continuitatea genetică a speciilor este asigurată de un număr foarte mic de enzime ce participă în procesul de duplicare, aceleași care au asigurat continuita-

Scanned with OKEN Scanner

tea speciilor respective timp de sute de milioane de ani. Numărul redus de enzime participante în duplicarea lanțurilor de ADN permite un control deosebit de riguros, reducînd în același timp la minim posibilitățile de eroare. Enzimele principale ale procesului de duplicare sînt ADN-*polimeraza* și ADN-*ligaza*.

Procesele de duplicare au fost și sînt încă cercetate mai ales pe culturi de microorganisme, ale căror celule se divid rapid și prezintă o mare simplitate, comparativ cu cele din lumea animală. Extrapolînd aceste rezultate în condițiile organismului uman, se înțelege din ce în ce mai bine cum au loc procesele normale de sinteză și mai ales cum apar o serie de tulburări genetice, datorate sintezei greșite a unor sisteme enzimatice.

ADN are o structură dublu helicoidală, cele două lanțuri putîndu-se desface la un anumit moment, fapt ce permite ca fiecare lanț să reformeze cîte o nouă moleculă de ADN. Acest proces poartă numele de *replicare semiconservativă*, în urma lui rezultînd hibrizi care păstrează fiecare cîte un lanț de la ADN parental. *Replicările conservative*, care nu duc la formarea de hibrizi, păstrîndu-se deci intacte formele parentale, sau cele *dispersive*, care se fac prin combinații secvențiale alternante de la cele două lanțuri parentale, nu sînt întîlnite în celulele umane. Existența replicării semiconservative a fost precizată cu ajutorul izotopilor radioactivi, marcîndu-se ADN cu ^{15}N; acesta, datorită densității diferite, poate fi separat de ADN cu azot obișnuit, precum și de hibrizii formați, prin centrifugare la o turație foarte mare.

Replicarea semiconservativă are loc, în linii generale, astfel: în celule, la un anumit moment, dublul helix se desface într-o zonă oarecare prin ruperea punților de hidrogen.

Odată cu declanșarea procesului de desfacere a dublului helix într-o zonă dată (care nu este aleasă la întîmplare), se declanșează și procesul de biosinteză a lanțurilor polinucleotidice noi pe matricea ce o constituie fiecare din cele două lanțuri ale ADN despiralat. Pentru sinteză sînt utilizați dezoxiribonucleotidtrifosfații (*d*ATP, *d*GTP, *d*CTP și *d*TTP), enzima care asigură legarea lor fiind ADN-polimeraza.

Utilizîndu-se sisteme acelulare în care erau prezenți dezoxiribonucleotidtrifosfații și ADN-polimeraza s-a constatat că sinteza nu are loc în lipsa unui ADN monocatenar (obținut de exemplu prin încălzirea ADN nativ). Se consideră că ADN despiralat are rol dublu în sinteză: pe de o parte constituie matricea care ordonează nucleotidele în lanțul care se sintetizează și cu care formează dublul helix, fapt susținut de identitatea compoziției nucleotidice a ADN despiralat cu a celui nou sintetizat; pe de altă parte el constituie „capătul" de care se vor prinde succesiv nucleotidele, în această calitate ADN despiralat servind ca „*primer*". Pentru a funcționa în calitate de primer ADN despiralat nu trebuie să fie înalt polimerizat.

Procesul de sinteză continuă paralel cu despiralarea pînă la formarea celor două molecule noi de ADN, complet identice (fig. 66).

Scanned with OKEN Scanner

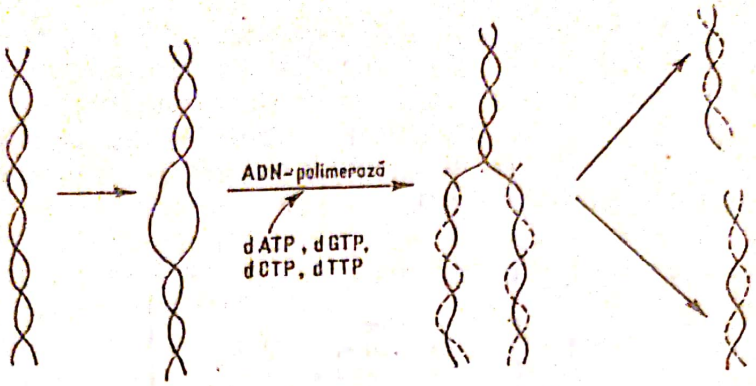


Fig. 66. Biosinteza lanţurilor polinucleotidice noi pe cele parentale.

ADN-polimeraza din *E. coli* este o proteină cu masa moleculară de 110 000, formată dintr-un singur lanţ proteic şi conţine aproximativ 1 000 de resturi de aminoacizi; se găseşte localizată în nucleu (într-o foarte mică proporţie şi în mitocondri). Enzima, acţionînd reversibil, are deci şi o acţiune hidrolitică, desfăcînd în anumite situaţii lanţul polinucleotidic în unităţile constitutive.

Sinteza noului lanţ are loc în direcţia opusă lanţului parental; dacă lanţul parental are hidroxilii terminali liberi în sensul **3′→5′**, în urma sintezei va lua naştere un lanţ în care hidroxilii terminali vor fi în sensul **5′→3′** (fig. 67):

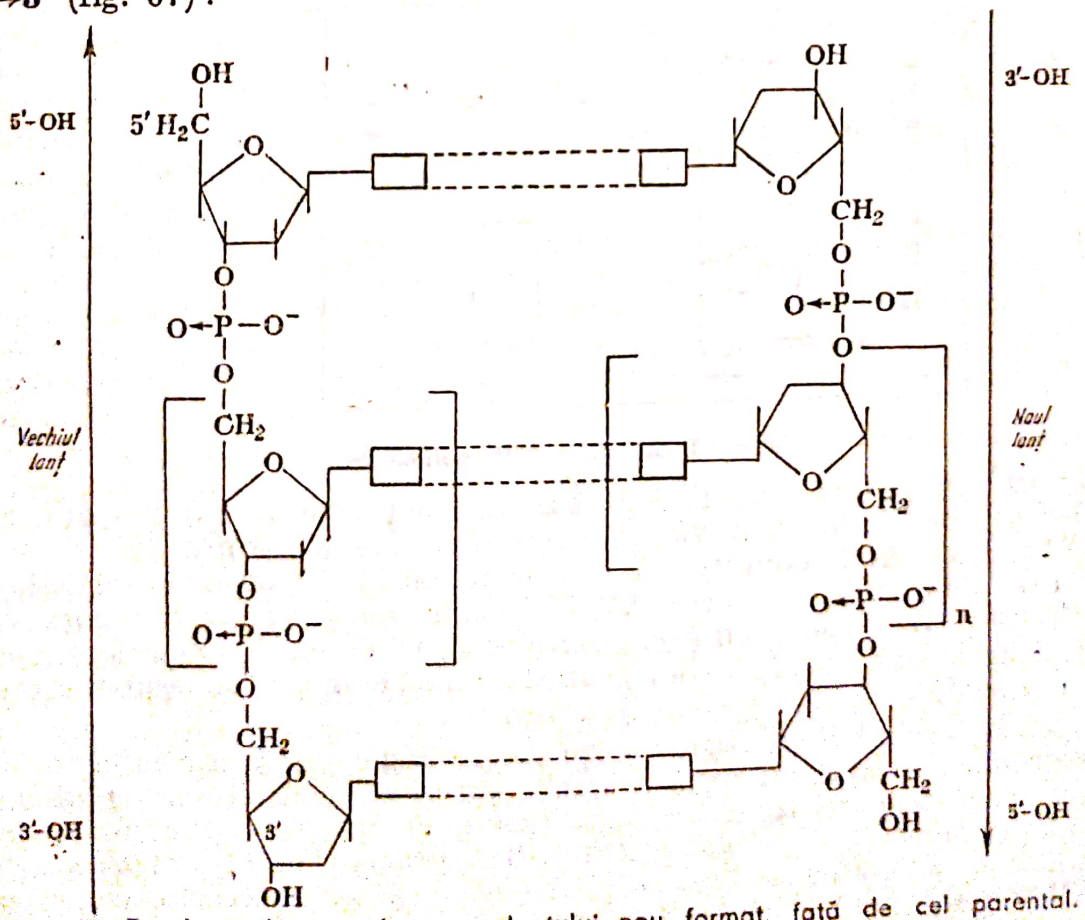
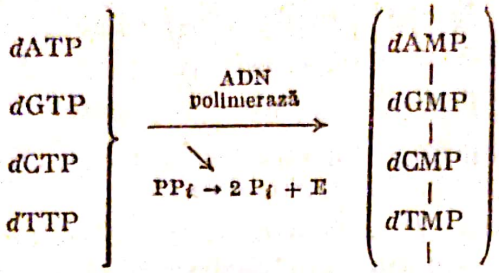


Fig. 67. Derularea în sens invers a lanţului nou format, faţă de cel parental.

Integrarea nucleotidelor în lanţurile noi necesită o cantitate însemnată de energie. Ea se obţine pe de o parte din legăturile macroergice ale nucleotizilor trifosforici care se rup pentru a furniza nucleotizii monofosforici (necesari sintezei) şi PP_i. Acesta din urmă se hidrolizează instantaneu la fosfat anorganic sub acţiunea pirofosfatazei, energia eliberată fiind utilizată tot în procesul de biosinteză.



Mecanismul catalizei prin ADN-polimerază este complex; s-a demonstrat că pe suprafaţa ADN-polimerazei există mai multe locusuri specifice de care se vor lega, în ordine, lanţul parental, porţiunea preformată a noului lanţ (*primerul*) şi dezoxipolifosfatnucleotidul ce va fi introdus în *primer* (fig. 68):

Viteza de sinteză a noului lanţ este deosebit de mare; se apre-

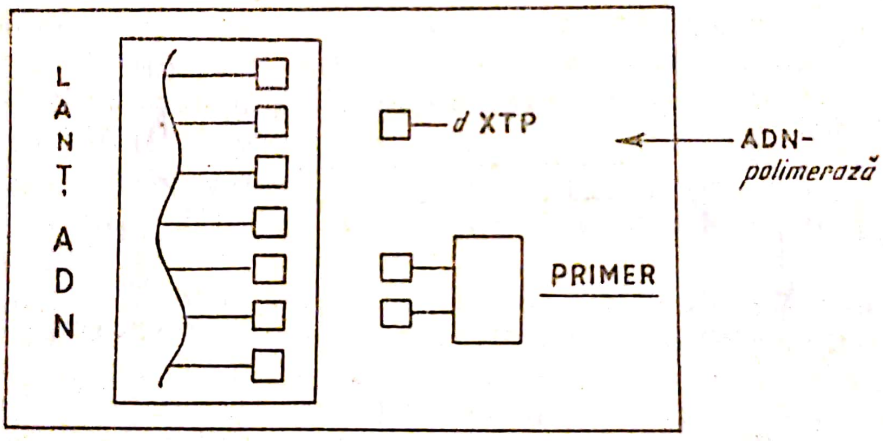


Fig. 68. Structura ADN-polimerazei.

ciază că atunci cînd este nevoie, sinteza poate porni simultan din mai multe puncte, astfel încît viteza creşte de nenumărate ori.

Acţiunea ADN-polimerazei este completată de acţiunea ADN-ligazei, care determină formarea ADN circular (de exemplu, mitocondrial) sau leagă între ele porţiuni preformate de ADN cu masă moleculară mică, mecanism recent elucidat. Nu se cunoaşte încă cum are loc legarea proteinelor specifice de moleculele nou formate.

Biosinteza ARN are loc în nucleu şi constă în copierea secvenţei nucleotidelor dintr-o anumită zonă a ADN, specifică unei anumite proteine; se formează cele trei tipuri de ARN care participă la sinteza proteinelor, şi anume, *mesager*, *ribozomal* şi *de transfer*. Procesul de biosinteză a ARN se numeşte *proces de transcriere* şi este asemănător procesului de sinteză a ADN descris anterior, fiind catalizat de ARN-*polimerază*. Procesul se

Scanned with OKEN Scanner

află sub un control riguros, citîndu-se existenţa unui factor proteic denumit factor δ, necesar declanşării activităţii enzimei, ca şi a unui alt factor ce determină încetarea procesului. Mecanismul de acţiune al ARN-polimerazei este asemănător celui al ADN-polimerazei, dar bazele complimentare întîlnite în ADN şi anume, A—T şi G—C, devin A—U şi G—C, în cazul ARN. De asemenea, în locul dezoxiribozei, ARN are riboză, prin urmare la sinteză participă ribonucleotidtrifosfaţii ATP, GTP, UTP şi CTP. În cazul sintezei ARN, creşterea lanţului polinucleotidic are întotdeauna loc în direcţia 5′→3′.

Transcrierea ARN se face după îndepărtarea histonelor de care este legat ADN. Nu se ştie cînd şi de cine este condiţionată această desfacere, dar se apreciază că intervine un factor de reglare.

9.6.3. BIOSINTEZA PROTEINELOR

Biosinteza proteinelor constituie unul dintre cele mai importante procese biologice datorită dinamicii cu care se realizează şi mai ales semnificaţiei majore pe care o reprezintă pentru toate organismele, indiferent de gradul lor de organizare. Procesul de biosinteză se găseşte într-un echilibru dinamic cu cel de degradare ce are loc la nivelul lizozomilor. În linii generale, toate etapele procesului de biosinteză a proteinelor au fost descifrate, cunoscîndu-se astăzi că el reprezintă suma a numeroase faze distincte. Starea optimă a organismului este condiţionată de o desfăşurare normală a acestui proces, orice modificare calitativă sau cantitativă în sinteza chiar a unei singure proteine putînd produce dereglări metabolice ce pot deveni patologice, mai ales dacă aceste modificări au loc la nivelul unei protein-enzime.

Biosinteza proteinelor, care se desfăşoară la nivelul polizomilor (poliribozomi) ataşaţi de reticulul endoplasmic, nu are loc în toate celulele cu aceeaşi intensitate. De exemplu, cele mai intense procese de sinteză se produc în ficat, organ unde se sintetizează un număr mare de proteine, iar cele mai lente în muşchi şi piele, ţesuturi care nu au roluri anabolice deosebite.

Se consideră că procesul de biosinteză a proteinelor începe în nucleul celular, unde se sintetizează cei trei acizi ribonucleici, mesager, ribozomal şi de transfer, care au transcrisă în secvenţa lor informaţia preluată de la ADN. Cei trei acizi ribonucleici părăsesc nucleul după sinteza lor şi, ajungînd în citoplasmă, se regrupează la nivelul reticulului endoplasmic. Pentru sinteza uneia din cele aproximativ cinci milioane de proteine ale organismului uman, cei trei ARN transcriu o anumită secvenţă a bazelor dintr-o zonă bine delimitată a ADN. Pentru a păstra nealterată sinteza proteinei date (ca şi a altora) ADN este un biopolimer metabolic stabil şi se replică (duplică), ADN din celula-fiică fiind absolut identic cu cel din celula-mamă, pe cale de distrugere.

Cele trei tipuri de ARN (v. „Nucleoproteine") au caracteristici diferite. Astfel ARN_m este ARN-ul cel mai labil; este monocatenar fiind format din 500 — 2 000 nucleotide. Are o viaţă foarte scurtă şi conţine o secvenţă complementară cu cea a unei zone a ARN_t; este vorba de trei

Scanned with OKEN Scanner

nucleotide vecine care alcătuiesc ceea ce se denumește curent un *codon*. ARN_t este mai stabil, cu masă moleculară mică, fiind format în medie din 80 nucleotide. În structura sa, astăzi precis definită, într-o anumită zonă, se găsește un triplet cu nucleotidele complementare codonului din ARN_m, denumit *anticodon*. Structura sa este în formă de trifoi ; la una din extremitățile lanțului se atașează un anumit aminoacid. Există cel puțin atîți ARN_t diferiți cîți aminoacizi naturali sînt, ARN_t specific și aminoacidul corespunzător, „recunoscîndu-se" cu mare ușurință. ARN ribozomal se găsește sub forma a trei tipuri cu mase moleculare de 28S, 18S și 5S. Intră în structura ribozomilor, formațiuni subcelulare care au rolul de a se lega de ARN_m și de enzimele implicate în procesul de biosinteză a proteinelor.

Ribozomii umani sînt formați din două subunități globulare de dimensiuni diferite — 40S și 60S — care se pot disocia acceptînd între ei un lanț de ARN_m, prin reunire formînd așa-numitul ribozom activ (fig. 69):

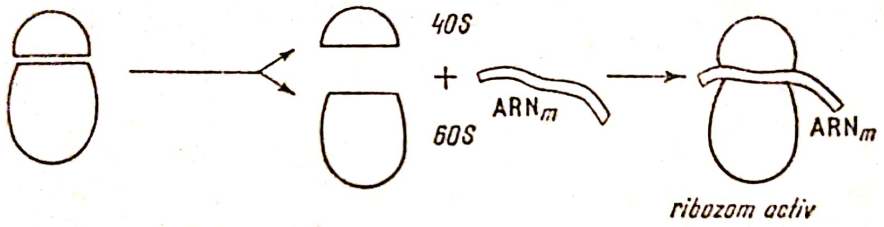


Fig. 69. Formarea ribozomului activ.

Mai mulți ribozomi se leagă de același ARN_m formîndu-se polizomi, sediul propriu-zis al sintezei proteinelor. Numărul de ribozomi ce se leagă de ARN_m depinde de lungimea lanțului polipeptidic ce urmează a se sintetiza, fiind, de exemplu, între 4 și 6 în cazul sintezei lanțurilor α ale hemoglobinei.

Înainte de descrierea etapelor propriu-zise ale biosintezei proteinelor trebuie precizată modalitatea înmagazinării informației genetice în ADN, precum și transmiterea și integrarea acesteia în structura ARN. Se cunoaște astăzi că informația ereditară este inclusă și codificată în structura moleculei de ADN prin intermediul celor patru baze azotate constitutive: adenina, guanina, citozina, și timina. Ordinea riguroasă în care se află cele patru baze dintr-o anumită zonă a ADN este copiată întocmai și transmisă celor trei tipuri de ARN ; dintre aceștia, ARN_m joacă rolul esențial în ordonarea aminoacizilor în lanțul polipeptidic ce urmează să se sintetizeze. Pentru codificarea unui aminoacid nu este suficient un nucleotid din ADN ; nici doi nucleotizi vecini nu pot realiza această codificare, fiind necesară unitatea formată din trei nucleotizi, numită triplet. Prin combinarea cîte trei a celor patru nucleotizi rezultă că sînt posibile 64 de triplete ($4^3 = 64$) ; nefiind însă decît 20 de aminoacizi ce trebuie integrați (2 din cei 22 prezenți în structura proteinelor se formează printr-o oxidare ulterioară a prolinei și lizinei cu formarea derivaților respectivi hidroxilați), rezultă că sînt mai multe triplete decît aminoacizi, deci fiecare aminoacid poate avea mai multe triplete.

Scanned with OKEN Scanner

Stabilirea tripletelor specifice fiecărui aminoacid a fost foarte dificilă. Primele cercetări pentru cunoașterea acestora au fost efectuate cu polinucleotide sintetice, și anume cu poliU care au fost introduse în locul ARN_m într-un sistem ce conținea toți compușii necesari sintezei proteice, inclusiv enzimele. A rezultat un lanț polipeptidic format numai din fenilalanină, deși în mediu erau prezenți toți cei 22 de aminoacizi identificați în structura proteinelor. S-a stabilit astfel că unul din tripletele de codificare ale acestui aminoacid este UUU. Identic, utilizîndu-se un polinucleotid format în întregime din poliC s-a sintetizat un lanț polipeptidic format numai din prolină, unul din tripletele acestui aminoacid fiind în mod evident CCC. Utilizarea în continuare a unor polinucleotide mixte a permis să se stabilească toate tripletele de codificare pentru aminoacizi, schema obținută purtînd numele de cod genetic (fig. 70) :

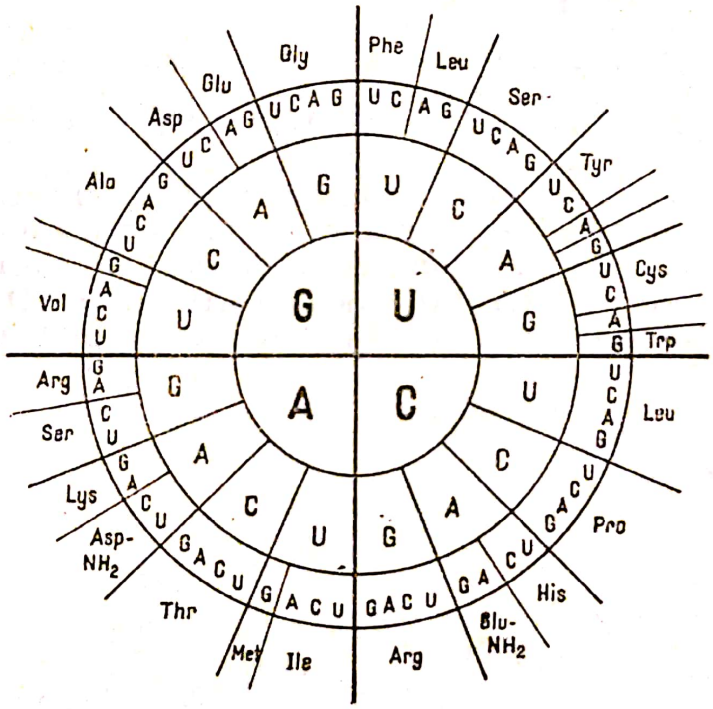


Fig. 70. Informația genetică pentru aminoacizi, realizată prin codul bazelor purinice și pirimidinice.

Din schema prezentată rezultă că pentru codificarea metioninei și a triptofanului există doar cîte un singur triplet și anume AUG, respectiv UGG. Pentru fiecare din ceilalți aminoacizi există între 2 — 6 triplete, plusul de triplete fiind considerat ca o „degenerare" a codului. Se remarcă importanța primelor două nucleotide în aceste triplete, în general cel de al treilea fiind diferit. Se constată și existența a trei codoni numiți „non sens" și anume UAA, UAG și UGA. S-a stabilit însă în cazul acestor triplete, care nu au rol în integrarea aminoacizilor în structura proteinelor, că îl dețin pe acela, remarcabil, de a încheia sinteza lanțului polipeptidic, oprind alungirea în continuare a acestuia.

Codul genetic este universal ; indiferent de gradul de organizare a organismului — monocelular, pluricelular, mamifer, inclusiv om — aminoacizii sînt codificați după aceeași schemă, aceleași triplete.

Scanned with OKEN Scanner

Reluînd schematic cele expuse mai sus, ADN se replică pentru a se permanentiza informaţia pe care o are înmagazinată în structură, informaţie ce este transmisă ARN-ului şi apoi tradusă prin formarea proteinelor specifice, cu secvenţa aminoacizilor corespunzătoare zonei copiate din ADN (fig. 71):

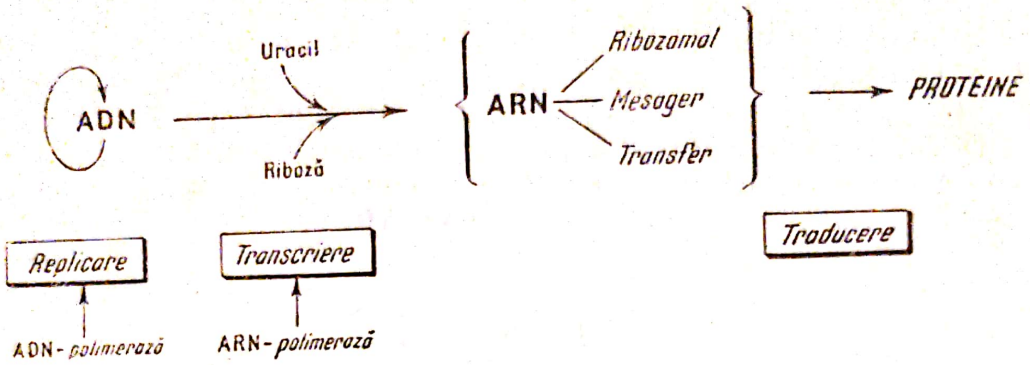


Fig. 71. Transferul informaţiei ADN → ARN → proteină.

Succesiunea reacţiilor care realizează transferul informaţiei în sensul ADN → ARN → proteină reprezintă aşa-numita **dogmă a biologiei moleculare**, constituind însă un domeniu dependent de biochimie.

Schema următoare redă mai detaliat participarea ADN, ARN, ribozomilor şi aminoacizilor la procesul de biosinteză a proteinelor (fig. 72):

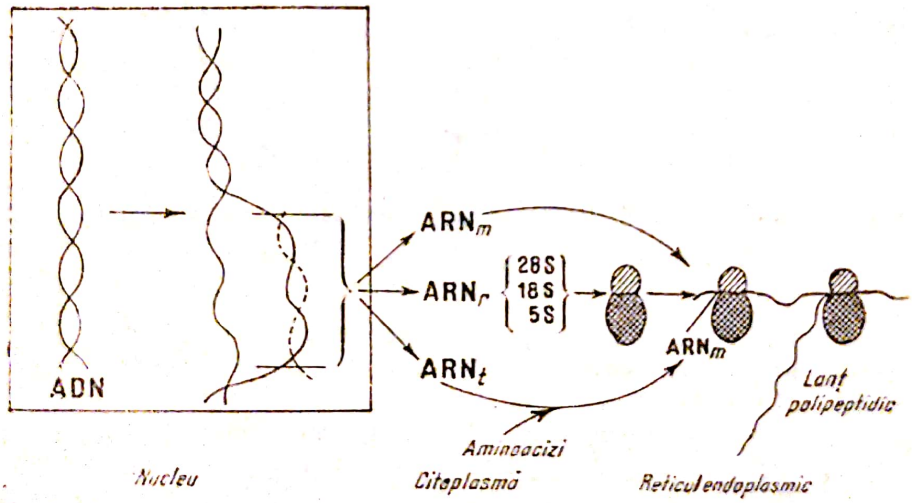


Fig. 72. Biosinteza proteinelor.

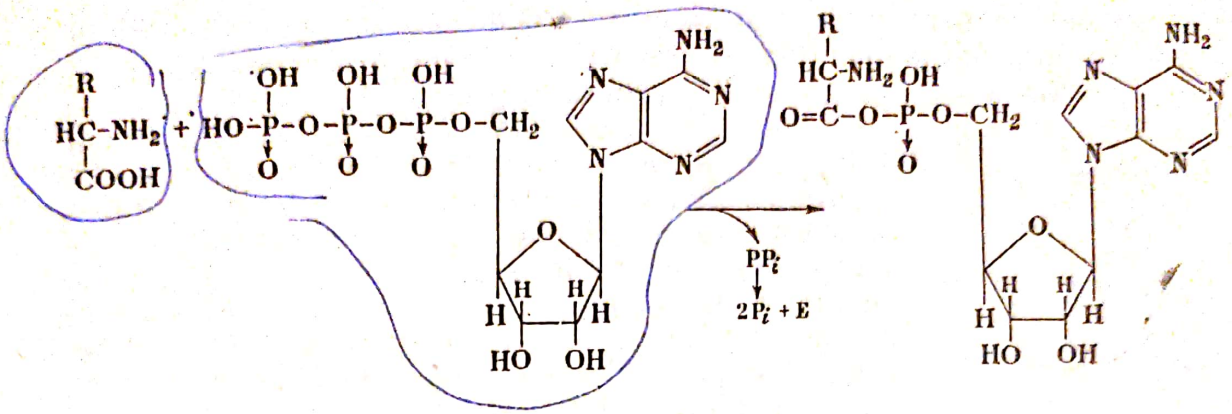
În prezent se consideră că există următoarele etape în procesul de biosinteză, fiecare etapă constînd dintr-o suită de reacţii:

— *activarea aminoacizilor*;
— *iniţierea sintezei lanţului polipeptidic*;
— *formarea lanţului polipeptidic* (*lungirea*, *elongaţia* sa);
— *încheierea sintezei* şi *desprinderea de ribozom* a lanţului polipeptidic.

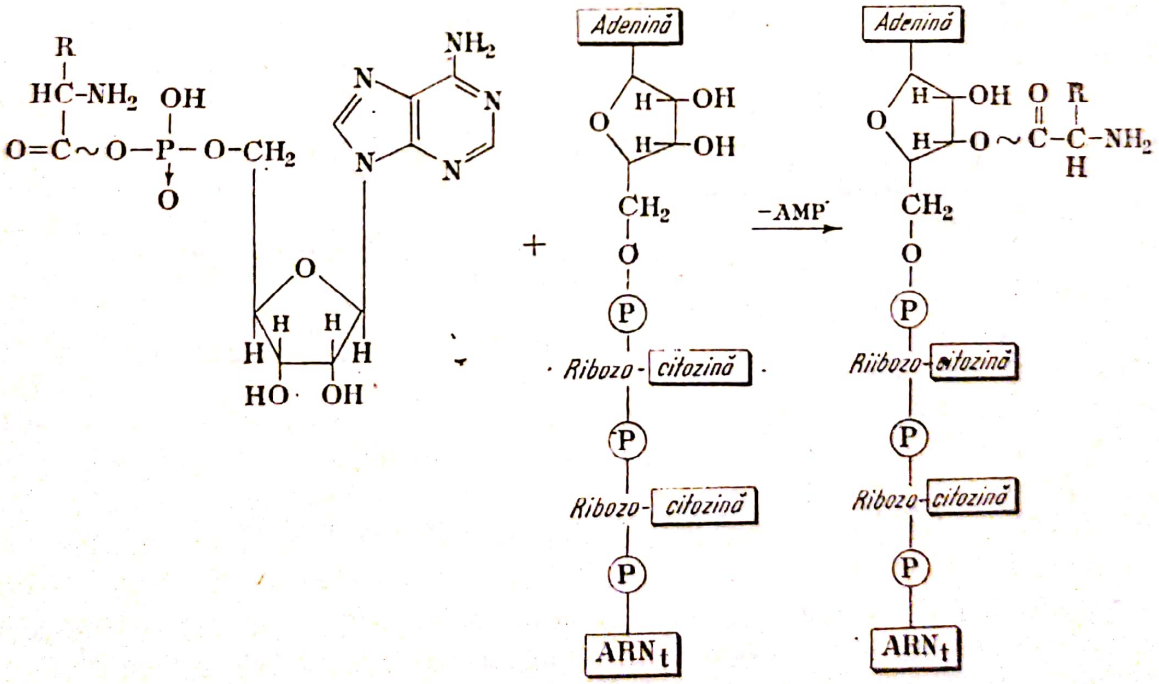
9.3.6.1. *Activarea aminoacizilor* are loc prin formarea unui „aminoacid activat", un aminoacil-AMP, evident activarea avînd loc în prezenţa

Scanned with OKEN Scanner

ATP (v. și „Ligaze"):



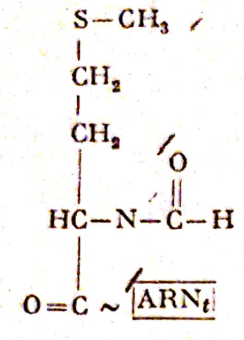
Aminoacizii activați sînt preluați de ARN$_t$ specifici, recunoașterea făcîndu-se prin anticodonul caracteristic fiecărui ARN$_t$. Formarea compușilor aminoacil-ARN$_t$ se face cu eliminarea de AMP. Legarea aminoacidului de ARN$_t$ are loc la nivelul ultimei baze azotate a lanțului polinucleotidic și care de obicei se termină cu secvența —C—C—A (v. „Nucleoproteine"):



Întreg procesul de activare și de legare a aminoacizilor de ARN$_t$ este catalizat de enzima denumită *ARN$_t$-sintetază* care posedă caracteristici specifice ce-i permit recunoașterea aminoacizilor și respectiv a ARN$_t$-ului corespunzător. Procesul de activare și de legare de ARN$_t$ nu poate avea loc decît în condiții de totală integritate structurală atît a aminoacidului, cît și a ARN$_t$-ului, fiecare modificare, oricît de mică, împiedicînd desfășurarea normală a reacțiilor descrise.

Scanned with OKEN Scanner

9.6.3.2. *Inițierea sintezei lanțului polipeptidic* are loc în toate cazurile prin intermediul aceluiași complex, respectiv *N-formilmetionină-ARN$_t$*. Deci codonul cu care începe sinteza este AUG de care se leagă anticodonul ARN$_t$ specific metioninei. În continuare sînt încorporați ceilalți aminoacizi, în ordinea codificată de ADN prin intermediul ARN$_m$:



N-formilmetionină-ARN$_t$

După cum s-a mai arătat între ARN$_m$ și ribozomi trebuie să se formeze complexe ARN$_m$-ribozom. În ribozomul „activat", ARN$_m$ se leagă de subunitatea cu masa moleculară mai mică, 40S, subunitate care cuprinde și trei factori polipeptidici de inițiere, denumiți F_1, F_2 și F_3 ; prin intermediul acestor factori se face și legarea de subunitatea ribozomală 60S. Ribozomii „se plimbă" de-a lungul ARN$_m$ și duc cu ei, alipiți, conform relației stricte ce există între codon și anticodon, aminoacil-ARN$_t$ corespunzător. În structura subunităților ribozomale 60S s-au precizat două zone, două locusuri de legare, denumite *locusul aminoacil* și *locusul peptidil* la nivelul cărora acționează și o serie de sisteme enzimatice specializate în formarea legăturii peptidice. În primul locus, cel aminoacil, se fixează ARN$_t$ ce transportă aminoacidul corespunzător, iar în al doilea are loc formarea legăturii peptidice dintre doi aminoacizi (fig. 73):

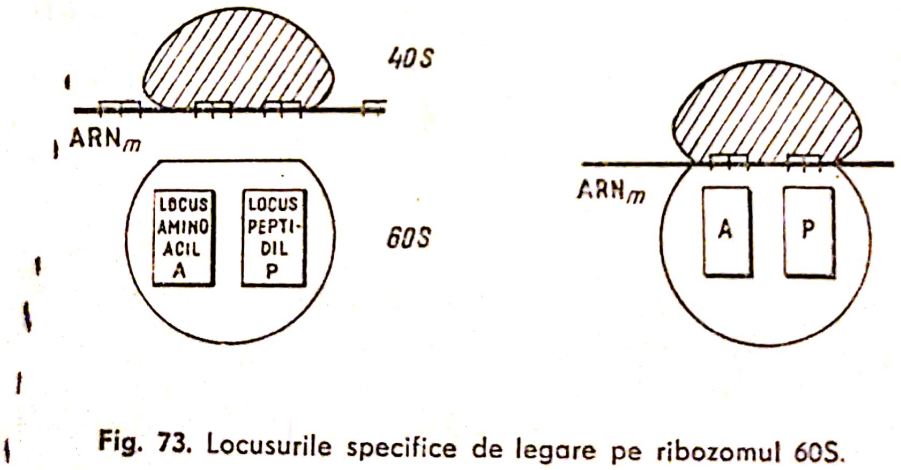


Fig. 73. Locusurile specifice de legare pe ribozomul 60S.

9.6.3.3. *Formarea lanțului polipeptidic* este un proces puternic endergonic, iar energia care-i este necesară se obține prin hidroliza GTP și nu a ATP.

De exemplu, dacă proteina care urmează să se sintetizeze are ca secvență inițială de aminoacizi glutamil-alanil-valil-tirozinil, procesele care au loc sînt următoarele : declanșarea sintezei se face prin legarea de codonul inițial AUG a N-formilmetionil-ARN$_t$ care ocupă locul peptidil din ribozom. În continuare au loc, simultan, două procese : prin mișcarea ribozomului se aduce glutamil-ARN$_t$, fixat inițial în locusul aminoacil, în dreptul locusului peptidil, lăsînd liber locusul aminoacil ; simultan se formează

Scanned with OKEN Scanner

prima legătură peptidică între N-formilmetionină și acidul glutamic, eliberîndu-se concomitent ARN_t ce a adus la nivelul ribozomului N-formilmetionina (fig. 74) :

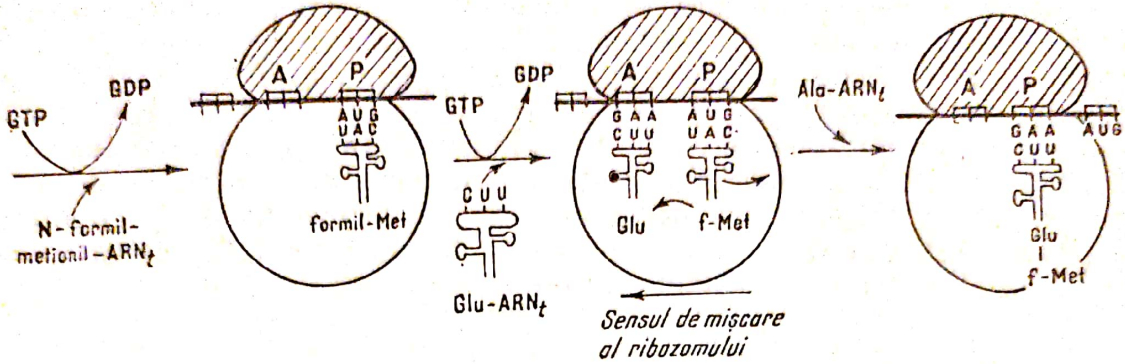


Fig. 74. Mecanismul formării lanțului polipeptidic.

Prin mișcarea ulterioară a ribozomului și formarea unei noi legături peptidice ia naștere peptidul N-formilmetionilglutamilalanil-ARN_t legat de ribozom în locusul peptidil, iar în locusul aminoacil se fixează următorul aminoacid adus de ARN_t și anume valil-ARN_t.

Mișcarea ribozomilor de-a lungul ARN_t continuă pînă ce în locusul peptidil ajunge un codon de încheiere, un „codon non sens" din cei trei posibili.

La sfîrșitul sintezei, N-formilmetionina este îndepărtată prin hidroliză.

9.6.3.4. *Încheierea sintezei și desprinderea lanțului polipeptidic de pe suprafața ribozomului* se realizează la semnalul codonului *non-sens*, precum și sub acțiunea unui *factor de eliberare* (*releasing factor*) de natură proteică. Un ARN_m nu poate sintetiza decît 2 — 3 lanțuri polipeptidice identice, catabolizîndu-se rapid, viața lui ținînd de regulă doar cîteva minute. Procesul de biosinteză a proteinelor este riguros controlat pe parcursul etapelor, începînd chiar de la transcriere.

Procesul de reglare al biosintezei proteinelor este foarte complex, antrenează numeroși factori de reglare, dintre care menționăm însăși concentrația proteinei ce urmează a fi sintetizată, hormoni (STH, insulină, cortizon), precum și unii factori citoplasmatici de natură proteică. Printre acești factori de reglare sînt și o serie de polipeptide represoare ce pot bloca sinteza prin fixarea lor pe o genă cu rol de reglare. La rîndul său, represorul este controlat de numeroși factori metabolici. Cunoașterea acestor procese este deosebit de importantă, deoarece în urma unor dereglări ale biosintezei proteinelor apar tulburări grave, așa-zisele dereglări de natură genetică, ce pot fi cantitative sau calitative. Se cunosc astăzi cîteva sute de afecțiuni genetice, datorate sintezei greșite a diferitelor proteine, mai ales dintre cele cu activitate enzimatică, hormoni, sau proteina transportoare de oxigen, hemoglobina.

Scanned with OKEN Scanner

9.6.3.5. *Inhibiția sintezei proteice*, asemănător inhibiției sintezei nucleotidelor, constituie un instrument valoros, cu multe utilizări posibile; din domeniul pur teoretic se trece tot mai mult la aplicații practice, terapeutice. Cele mai utilizate substanțe cu efect inhibitor al sintezei proteice provin din mediul de cultură al unor microorganisme, binecunoscutele și mult folositele antibiotice. Acestea inhibă procesul de biosinteză a microorganismelor patogene, existînd însă în același timp și inhibitori ai sintezei celulare, utilizați în tratamentul cancerului. Acțiunea lor are loc selectiv la nivelul tuturor etapelor de biosinteză, începînd de la procesul de duplicare al ADN și pînă la lungirea lanțului polipeptidic. Dintre aceste antibiotice notăm mitomicina, actinomicina, streptomicina și puromicina, care blochează, în ordine, replicarea ADN, formarea ARN_m, interacțiunea ARN_m cu ribozomii și în sfîrșit formarea lanțului peptidic.

Scanned with OKEN Scanner

10 SISTEME DE AUTOCONTROL ȘI REGLARE. BIORITMURI

Conceptul de reglare şi control pentru biosisteme presupune menţinerea unei homeostazii dinamice prin mecanisme de bio-*feedback* pozitiv şi negativ. Se cunosc unele aspecte ale mecanismelor moleculare în relaţie cu cele funcţionale care acţionează continuu, pentru menţinerea homeostaziei dinamice. Apariţia primelor forme de viaţă, evoluţia şi variabilitatea lor pînă la om, ţin de procese complexe de reglare şi control molecular, integrate funcţional pentru acomodarea la ambianţă.

Un prim aspect care interesează reglarea şi controlul este legat de modul de acţiune a legii maselor în biosisteme în interrelaţie cu bio-*feedback-ul*.

Alt aspect este cel de intercondiţionare dintre energia care ia naştere în ciclurile metabolice şi utilizarea informaţiei în biosisteme, relaţia de modulare energie-informaţie.

Al treilea aspect interesează intervenţia catalizatorilor, care dirijează şi sincronizează întreaga activitate şi dinamică biologică, aflîndu-se în relaţie de modulare cu controlul prin legea acţiunii maselor şi controlul energie-informaţie, atît în sistemele mai simplu organizate, cum sînt microorganismele, cît şi în cele hipercomplexe cum este omul.

10.1. MODULAREA ȘI REGLAREA ACTIVITĂȚII ENZIMELOR

Sistemele enzimatice din organismele vii sînt factorii cei mai dinamici şi cu acţiune decisivă în evoluţia şi menţinerea funcţională a biosistemelor. Activitatea enzimelor depinde de mai mulţi parametri, care la rîndul lor controlează întregul metabolism celular. Dintre factorii cei mai importanţi şi mai bine studiaţi pot fi reamintiţi următorii :

a) informaţia şi controlul genetic care este deţinut de ADN în relaţie cu ARN ;

b) controlul şi autocontrolul unor factori locali, specifici fiecărui sistem enzimatic (*p*H, activatori, inhibitori, substrat);

Scanned with OKEN Scanner

c) natura substratului asupra căruia sistemul enzimatic își exercită influența catalitică și care, în funcție de timp, este exprimat prin relația : $\frac{dE}{dt} = k_s - k_d$ (k_s = constanta de sinteză a enzimei, k_d = constanta de degradare a enzimei).

La parametri de mai sus se mai pot adăuga două aspecte importante care completează modul de acțiune al enzimelor :

— activitatea depinde de legea acțiunii maselor, deci trebuie luați în considerație nu numai compușii care intră în reacție, ci și produșii rezultați din reacții ;

— controlul este exercitat prin mecanisme de bio-*feedback*, pozitiv și negativ.

Reglarea homeostaziei dinamice din organismul animal se face prin mecanismul de *feedback* pozitiv și negativ, care la rîndul său are la bază reacțiile oscilatorii moleculare prin care sînt induse reacțiile catalizate și dirijate de sistemele enzimatice.

Sistemele enzimatice în acțiunea lor sînt controlate de concentrația produșilor de reacție, atît din etapele intermediare, cît și din etapele finale. Reglarea se mai face prin efectori alosterici, numiți și modulatori de reacție. Enzimele de reglare fac parte la rîndul lor din complexe multienzimatice, în care prima secvență de reacție este, la rîndul său, un modulator de reacție (reacție limitantă de viteză).

Acțiunea sistemelor enzimatice reglatoare de reacție se bazează pe următoarele efecte de cooperare : 1) homotropie ; 2) heterotropie și 3) homotropie-heterotropie.

În *reglarea homotropică*, substratul de reacție este un activator al centrului catalitic enzimatic. *Reglarea heterotropică* se bazează pe acțiunea activatoare a unor compuși de reacție, intermediari sau finali. Cele mai multe dintre sistemele enzimatice se reglează prin cele două *mecanisme homotropie-heterotropie*, realizînd în acest mod o autoreglare molecular-spațială.

Ca exemplu de reglare și autoreglare enzimatică, se poate examina sistemul de sinteză a *L*-izoleucinei. Trecerea treoninei la *L*-izoleucină se face prin patru intermediari (S_2, S_3, S_4, S_5), necesitînd tot atîtea sisteme enzimatice specifice notate cu E_1, E_2, E_3, E_4, E_5.

Fiecare etapă este, la rîndul său, în interrelație cu alte cicluri metabolice, care nu sînt trecute în schema alăturată, dar care influențează echilibrul de reacție, atît parțial, cît și final.

Controlul final este exercitat de însăși molecula de *L*-izoleucină, care induce un efect de represie asupra unor etape de reacție, așa cum se poate vedea și din figura 75.

Este evident, că inducția enzimelor se face în perfectă modulare cu informația stocată pe ADN, specifică pentru fiecare reacție catalitică.

Una din problemele interesante legate de biosinteza enzimelor este că informația stocată pe ADN și reglarea endocrină pot fi parțial corelate și interpretate prin inducția exercitată de hormonii sexuali feminini. Aceștia induc un efect de reglare și autocontrol asupra sintezei de enzime prin intermediul ADN-ARN. Efectul inductiv se exercită în concentrație de

Scanned with OKEN Scanner

$10^{-10}M$, asupra ARN_m, care ulterior îl transmite ca semnal de răspuns funcţional caracteristic în sinteza de enzime specifice.

Este posibil ca una din diferenţele între cele două sexe, pînă la menopauză, ca incidenţă şi frecvenţă a diferitelor aspecte din patologia cardiovasculară, să fie influenţate de activitatea hormonilor sexuali feminini şi

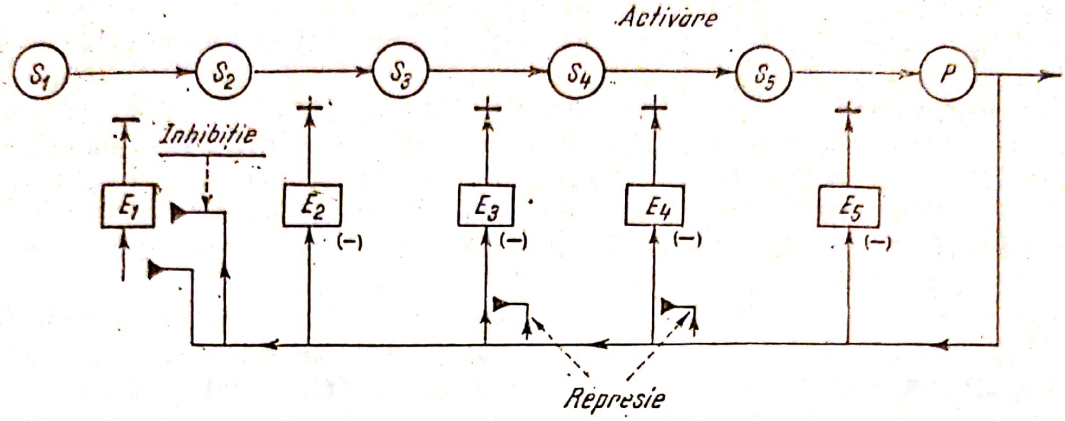


Fig. 75. Autoreglarea biosintezei *L*-leucinei.

masculini. Transferul de informaţie de la ADN la ARN şi de aici la proteine şi enzime, permite autoreglarea şi autocontrolul miilor de reacţii care au loc în celulă.

Mai există ipoteza existenţei unor sisteme enzimatice specifice în peretele arterial în relaţie cu hormonii sexuali, care să protejeze sexul feminin pînă la menopauză de leziuni ateroscleroase. Aceste sisteme enzimatice fiind în strînsă relaţie cu hormonii sexuali feminini, sînt implicit şi cu procesele de coordonare nervos-centrale care diferă între cele două sexe.

10.2. REGLAREA ŞI CONTROLUL MOLECULAR-FUNCŢIONAL PRIN HORMONI

Activitatea fiziologică a organismelor animale este condiţionată de desfăşurarea normală a proceselor biochimice, care sînt influenţate de concentraţia relativ constantă în funcţie de vîrstă a numeroşi şi importanţi metaboliţi din ţesuturi şi lichide, cît şi de mecanismul neurohormonal cu rol de coordonare şi autoreglare.

Hormonii influenţează desfăşurarea proceselor biochimice, accelerînd sau inhibînd reacţiile metabolice din organism. Secreţia lor se află sub dependenţa sistemului nervos central, fiind factorii de reglare a acestuia la nivel celular şi molecular, acţionînd ca mesageri chimici şi biocatalizatori endogeni.

Prin funcţiile pe care le îndeplinesc, hormonii controlează viteza şi sensul de desfăşurare a proceselor metabolice, influenţînd direct activitatea specifică a complexelor enzimatice. În acest mod intervin în desfăşurarea metabolismului glucidelor, proteinelor, lipidelor, în echilibrul hidromineral; hormonii îşi reglează şi controlează chiar metabolismul propriu.

Scanned with OKEN Scanner

Hormonii secretaţi de celulele glandelor endocrine sînt substanţe cu structură chimică binecunoscută, fiind derivaţi de la aminoacizi, polipeptide şi substanţe sterolice.

Prin modul de acţiune şi mecanismul intim prin care îşi exercită influenţa sînt consideraţi ca inductori ai biocatalizatorilor, avînd unele din proprietăţile catalizatorilor şi anume: acţionează în cantităţi mici, măresc viteza de reacţie, dar nu modifică echilibrul termodinamic al reacţiilor biologice şi se regăsesc aproape integral după desfăşurarea procesului catalizat. Astfel, tiroxina în concentraţie de $10^{-6}M$ accelerează metamorfoza batracienilor; adrenalina în cantitate de 10^{-6} M ridică presiunea arterială a unei pisici de 2 — 3 kg; foliculina în concentraţie de $10^{-9}M$ declanşează transformarea caracteristică rutului pe epiteliul vaginal al unei şobolance impubere de 150 g etc. Aceste efecte declanşate de cantităţi mici de hormoni permit deducţia că ei acţionează prin intermediul enzimelor.

În sprijinul celor de mai sus se poate aduce şi următorul exemplu: s-a constatat că 10^{-7} g de hormon hipotalamic CRF determină eliberarea din hipofiza anterioară a unui microgram de ACTH. Acesta, în continuare stimulează corticosuprarenala, care eliberează în circulaţie aproximativ 40 µg de hormoni corticoizi, care, la rîndul lor, favorizează sinteza a 5,6 mg de glicogen. Din acest exemplu reiese că prin intermediul hormonilor s-a realizat o amplificare a efectelor biologice de 56 000 de ori.

10.2.1. MODUL DE ACŢIUNE A HORMONILOR

Hormonii hipofizari acţionează asupra glandelor cu secreţie internă, stimulîndu-le activitatea. Anumiţi centri ai diencefalului produc neurosecreţie, care este adusă prin sistemul port la lobul hipofizar anterior, unde stimulează secreţia de ACTH. Acesta fiind un hormon endocrinotrop, va acţiona la rîndul său asupra glandei suprarenale, stimulînd secreţia de hormoni de către aceasta, astfel încît în fluxul sanguin să intre o cantitate mare de hormoni corticosuprarenali. Aceştia, la rîndul lor, vor ajunge pe cale sanguină la nivelul hipofizei, unde vor interveni în reglarea ACTH-ului, stimulîndu-i sau inhibîndu-i secreţia în funcţie de nevoile organismului, aşa cum se vede şi din figura 76, care dă o imagine asupra fenomenelor de autoreglare hormonală, prin mecanisme de *feedback* pozitiv şi negativ.

Mecanismul biochimic de acţiune a hormonilor se exercită atît direct, cît şi prin intermediul enzimelor.

Hormonii acţionează asupra sintezei de enzime la nivelul nucleului celular, mai ales hormonii steroizi, şi stimulează sinteza de ARN care va contribui la sinteza de enzime specifice, acestea intervenind în ciclurile stereotipe ale metabolismului intermediar.

Unii dintre hormoni, cum este tiroxina, acţionează direct asupra unor sisteme enzimatice, ca în cazul celor care participă în fosforilarea oxidativă.

Mulţi hormoni intervin la nivelul membranelor celulare, influenţînd transportul activ şi potenţialul de membrană. Astfel, substanţele normale care participă la reacţiile din metabolismul intermediar ca aminoacizi,

Scanned with OKEN Scanner

glucide, lipide şi ioni pozitivi sau negativi, sînt dependenţi de inducţia hormonilor. Sînt cunoscute în acest sens lucrările cu privire la rolul insulinei în diabet şi la influenţa pe care o exercită acest hormon asupra sistemelor enzimatice din clasa hexokinazelor, care catalizează intrarea glucozei în celulă.

Hormonii au un efect inductor în formarea nucleotidelor ciclice de tipul AMP_c şi GMP_c prin acţiunea pe care o au asupra enzimelor specifice (adenil- şi guanilciclazele). Se cunoaşte interrelaţia dintre calciu şi hormonii paratiroidieni, influenţa acestora asupra adenilciclazei, a fosforilării oxidative şi a transmiterii informaţiei nervoase.

Alt mecanism molecular de acţiune al hormonilor este acela de control asupra genelor şi de inducţie pe ADN. Acest mod de reglare explică acţiunea hormonului somatotrop şi a hormonilor sexuali. Cert este faptul că există permanent o interacţiune între hormoni şi sistemele enzimatice şi că această interacţiune se exercită prin sisteme de autocontrol şi de autoreglare, atît hormonal, cît şi enzimatic, prin intermediul produşilor de reacţie.

Cercetări efectuate recent evidenţiază că hormonii steroizi acţionează în biosisteme prin intermediul unor receptori specifici care influenţează activitatea enzimelor. Receptorii specifici sînt proteine formate din două subunităţi notate cu *A* şi *B*, cu masă moleculară de 100 000, care complexează selectiv hormoni; sub această formă induc semnale în sinteza de enzime la nivelul ADN şi ARN. Complexul format între hormoni şi receptorii specifici sub formă de dimeri controlează sinteza enzimelor specifice în relaţie cu informaţia genetică. În acest mod se poate explica mecanismul de inducţie, amplificare şi selectivitate pe care hormonii sexuali cu structură sterolică îl exercită în funcţie de timp şi informaţie genetică în biosisteme.

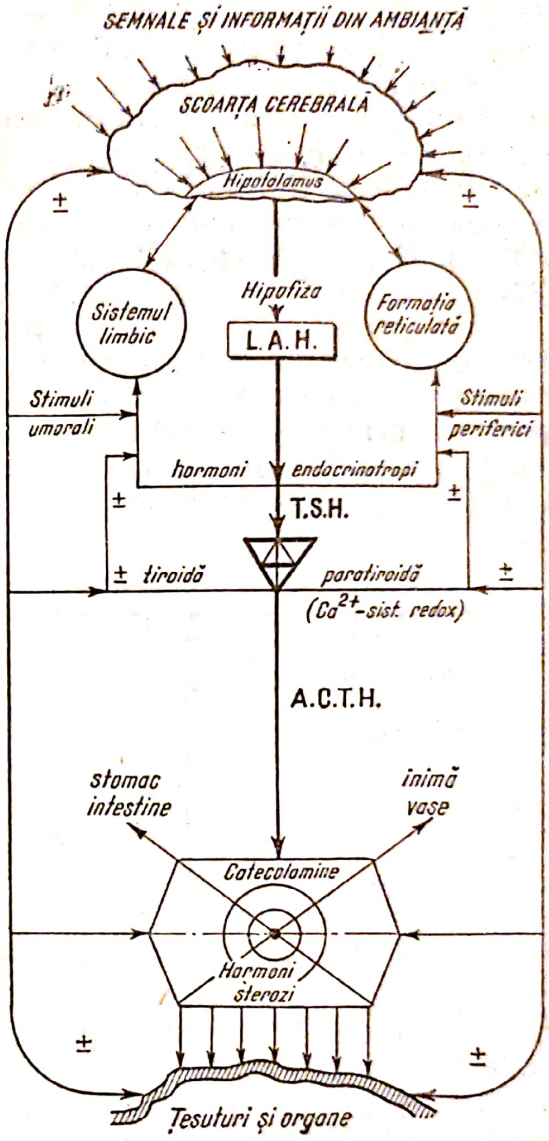


Fig. 76. Autoreglarea hormonală prin mecanismul feedback pozitiv şi negativ (recepţie, funcţie, informaţie, bioritmuri modulare).

Hormonii induc informaţii asupra reacţiilor din celule, ţesuturi şi organe tot prin intermediul reacţiilor catalizate. Diferă însă de enzime prin mărimea moleculei, fiind compuşi cu mase moleculare mici, prin struc-

Scanned with OKEN Scanner

tura lor, cît şi prin concentraţia de acţiune, fiind activi la valori de 10^{-6} la 10^{-12} M.

Modul lor de acţiune este reglat de sinteza şi excreţia din glandele endocrine, de transportul şi receptorii de la nivelul membranelor. Alt factor care influenţează sensibil activitatea lor este informaţia ereditară, care se manifestă şi în cazul enzimelor.

Mecanismul de acţiune este cel de amplificare şi modulare a unor semnale din reacţiile metabolismului intermediar. Hormonii stimulează sinteza de enzime în ribozomi, influenţînd translaţia informaţiei purtată de ARN_m pentru producerea de enzime şi proteine specifice. De asemenea acţionează asupra enzimelor de formare a compuşilor macroergici de tipul ATP şi GTP, influenţînd sinteza nucleotidelor ciclice de forma AMP_c şi GMP_c, cu rol de reglare şi control.

Filogenetic, este posibil ca primul sistem de reglare prin intermediul hormonilor să fie format printr-o relaţie de intercondiţionare între hormoni şi sistemele enzimatice care, ulterior, au influenţat sinteza ADN-ARN pentru stocarea şi transmiterea informaţiei. Trecerea unor aminoacizi în compuşi cu rol de hormoni este relativ simplă şi se poate rezuma la decarboxilare şi oxidare, cum este cazul în sinteza noradrenalinei.

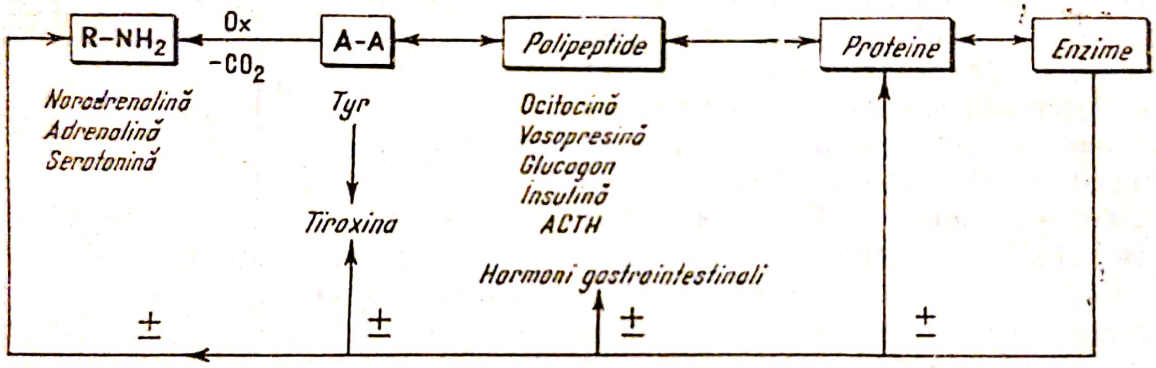


Fig. 77. Interrelaţiile aminoacizilor cu hormonii polipeptidici şi enzimele.

Din figura 77 se poate aprecia interrelaţia dintre aminoacizi, hormoni polipeptidici şi enzime.

Din punct de vedere al structurii chimice, hormonii se pot clasifica ca fiind derivaţi din aminoacizi, polipeptide, proteine şi steroizi.

10.2.2. ADRENALINA ŞI NORADRENALINA

Aceşti doi hormoni sînt secretaţi de medulosuprarenală şi de ţesuturi cromafine, rezultînd în cantitate mare din tirozină. Biosinteza este catalizată de sisteme enzimatice specifice, care necesită prezenţa ionilor de cupru. Echilibrul dintre cei doi compuşi este în funcţie de stimulii din ambianţă.

Acţiunea fiziologică constă în următoarele : participă la menţinerea tonusului vascular şi, posibil, venos ; intervin în contracţia muşchilor

Scanned with OKEN Scanner

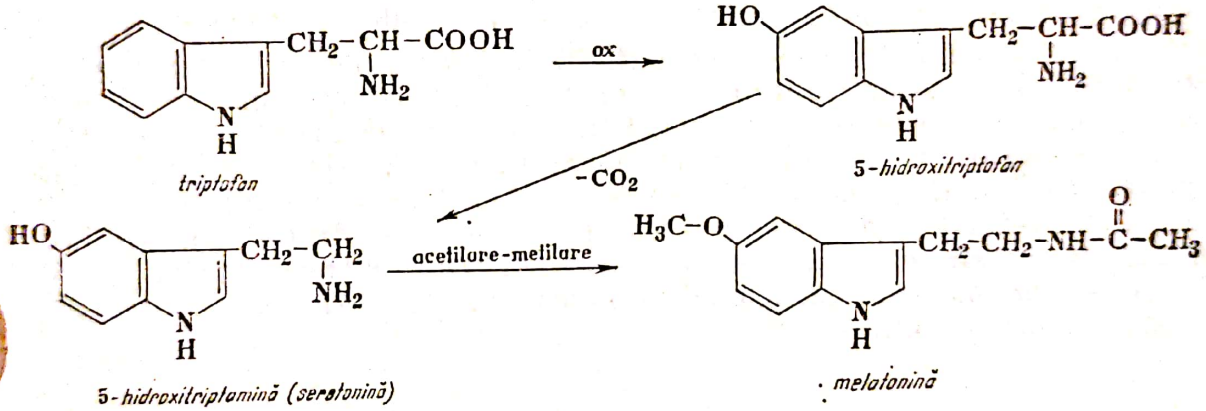
netezi ; sînt inductori ai glicogenolizei din ficat şi muşchi, fiind în antagonism cu insulina şi sinergism cu glucagonul ; sînt neurotransmiţători ai informaţiei nervoase cu rol de modulare organism-ambianţă.

Hipersecreţia de noradrenalină şi adrenalină în ţesuturile cromafiine duce la formarea de tumori cunoscute sub denumirea de pheocromo c-tome.

10.2.3. SEROTONINA SAU 5-HIDROXITRIPTAMINA (5-HT)

Cantitatea cea mai mare de serotonină a fost evidenţiată în creier, unde participă la reglarea metabolismului cerebral şi a proceselor psihocomportamentale.

Sinteza serotoninei se face din triptofan, în prezenţa enzimelor specifice, după reacţiile :



Din punct de vedere fiziologic serotonina este un compus cu activitate vasoconstrictoare şi stimulator al contracţiei muşchilor netezi. În acest sens acţionează probabil sinergic cu adrenalina şi noradrenalina, ca un sistem de reglare şi control al tonusului vascular central şi periferic.

Rolul serotoninei în metabolismul cerebral este legat în primul rînd de stările psihocomportamentale. De exemplu, în cazul scăderii concentraţiei din creier sub anumite limite se produc stări agresive.

Cantităţi mari de serotonină apar în urină în tumorile maligne carcinoide, care sînt considerate ca fiind induse de anomalii în metabolismul triptofanului.

10.2.4. MELATONINA SAU N-ACETIL-5-METOXISEROTONINA

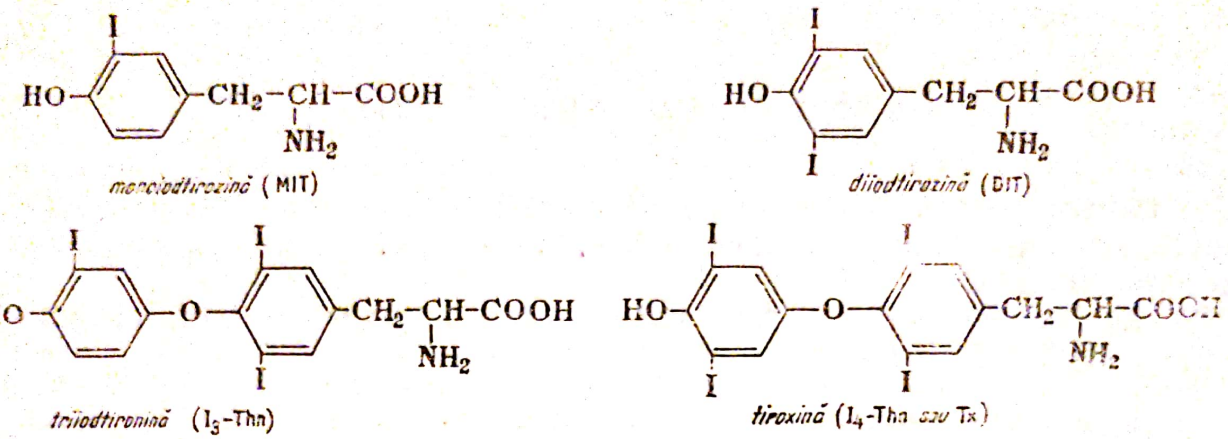
Melatonina este un hormon secretat de glanda pineală, cu rol în modularea ciclurilor bioritmice circadiene.

În capitolul următor de bioritmuri se va vedea biosinteza şi acţiunea fiziologică a acestui compus.

Scanned with OKEN Scanner

10.2.5. TIROXINA

Tiroxina este secretată de glanda tiroidă sub forma unui amestec de compuși iodați de tirozină, tiroxină și triodotrionină :



Activitatea fiziologică este strîns legată de procesul de creștere și maturație al organismului. Lipsa totală a hormonilor tiroidieni duce la *cretinism*, iar hiposecreția la *mixedem*. Hiperfuncția glandei tiroide provoacă o exaltare a întregului metabolism intermediar caracterizat funcțional prin mărirea metabolismului bazal, tahicardie și exoftalmie.

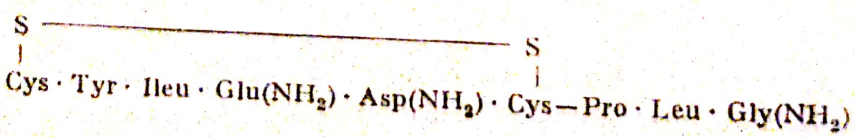
Intervenind în reacțiile de fosforilare oxidativă din mitocondrii, hormonii tiroidieni reglează repartiția energiei libere între compușii macroergici și energia calorică, glanda tiroidă avînd în acest mod rol termoreglator al organismului.

10.2.6. CALCITONINA

Este un hormon de natură polipeptidică, secretat de paratiroidă și avînd în moleculă 32 de aminoacizi. Împreună cu vitaminele D reglează metabolismul calciului.

10.2.7. OCITOCINA

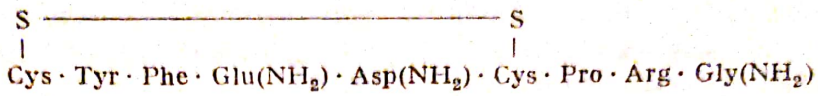
Acest hormon secretat de lobul posterior al hipofizei este format prin unirea a opt aminoacizi :



Participă la contracțiile ritmice ale mușchiului uterin.

10.2.8. VASOPRESINA

Este secretată de lobul posterior al hipofizei, fiind asemănătoare cu ocitocina :



Acţionează asupra vaselor menţinînd tonusul presiunii sangvine în capilare şi artere. Intervine în metabolismul hidric cu acţiune antidiuretică. Secreţia în cantităţi insuficiente duce la diabetul insipid caracterizat prin poliurie şi evident ingestie mare de apă.

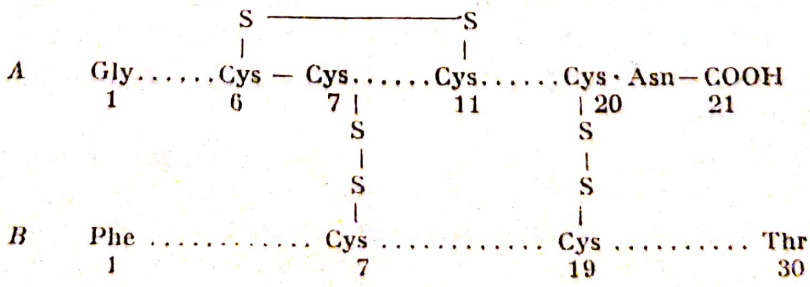
10.2.9. GLUCAGONUL

Acest hormon polipeptidic este format din 29 de aminoacizi şi secretat de celulele alfa din pancreasul endocrin. Comparativ cu insulina nu conţine cisteină, prolină şi izoleucină, dar conţine în schimb metionină şi triptofan.

Activitatea sa este antagonistă cu a insulinei. Stimulează glicogenoliza hepatică cu producerea de hiperglicemie. Acizii graşi liberi induc o inhibare a secreţiei de glucagon, iar arginina o stimulare. Adrenalina şi noradrenalina, care au activitate alfa şi beta-adrenergică, induc stimularea secreţiei de glucagon, mai cu seamă în stările de *stress* cînd este inhibată activitatea insulinei. Adenilciclaza este un receptor selectiv pentru glucagon la nivelul ficatului.

10.2.10. INSULINA

Insulina este secretată de celulele beta din pancreasul endocrin. Structura sa este formată din două lanţuri polipeptidice : lanţul *A* conţine 21 aminoacizi, iar lanţul *B* are 30 de aminoacizi. Cele două catene sînt legate între ele prin punţi disulfurice :



În pancreas se sintetizează ca proinsulină, compus avînd suplimentar un polipeptid format din 33 de aminoacizi, care uneşte cele două catene şi care se hidrolizează sub acţiunea unei proteaze specifice.

Scanned with OKEN Scanner

Acţiunea fiziologică a insulinei este de stimulare a utilizării glucozei în ţesuturi, favorizînd trecerea acesteia prin membranele celulare. Excesul de glucoză este trecut sub formă de glicogen, proces stimulat de insulină şi inhibat de glucagon. În acest mod relaţia dintre glucagon şi insulină modulează concentraţia activă de glucoză din circulaţie.

Deficienţa de secreţie a insulinei este asociată cu diabetul zaharat, caracterizat prin hiperglicemie, cetonemie, glicozurie şi favorizarea leziunilor vasculare cu inducţie de ateroscleroză.

10.2.11. SOMATOTROPINA

STH este secretat de lobul hipofizar anterior, fiind o proteină formată din 191 de aminoacizi cu masa de 21 500.

Activitatea sa fiziologică este de stimulare a întregului metabolism intermediar şi dirijarea creşterii organismului. Excesul de STH provoacă la copil gigantismul, iar lipsa piticismul.

Intervine ca un stimulator al metabolismului proteic cu retenţie de azot, creşterea sintezei de proteine şi de colagen. Asupra metabolismului lipidic şi glucidic are acţiune de intensificare a lipolizei şi respectiv a glicolizei.

Influenţează metabolismul mineral, începînd cu absorbţia calciului la nivelul intestinului subţire. Induce semnale de reglare asupra apatitei din structura oaselor şi a echilibrului dintre magneziu şi fosfaţii alcalini.

Hormonul de inhibare a somatotropinei este secretat de hipotalamus şi este un polipeptid format din 14 aminoacizi cu o punte disulfurică. Acesta are acţiune negativă nu numai asupra hormonului de creştere, ci şi asupra secreţiei de insulină, glucagon, tireotropină şi FSH.

10.2.12. LUTEOTROPINA

LTH este secretat de lobul hipofizar anterior, fiind o proteină cu masa de 23 000. Stimulează formarea şi maturaţia glandei mamare cu inducerea lactaţiei, în paralel cu dezvoltarea corpului galben. Acţionează sincron cu hormonul de creştere, dar este mai puţin activ asupra proceselor anabolice generale.

10.2.13. GONADOTROFINELE

Sînt substanţe cu acţiune hormonală care influenţează maturaţia testicolului FSH şi a ovarului LH. Structural sînt glicoproteine cu mase de 25 000 (FSH) şi 40 000 (LH).

Scanned with OKEN Scanner

10.2.14. HORMONUL TIREOTROP

Este tot o glicoproteină cu masa de 30 000 secretată de lobul hipofizar anterior.

Acţionează asupra tiroidei, stimulînd biosinteza şi secreţia de hormoni tiroidieni. În acest mod, intervine în procesele redox, activînd reacţiile exergonice, prin intermediul derivaţilor ioduraţi de forma tiroxinei.

Influenţează receptorii specifici de activare a adenilciclazei din glanda tiroidă, cu creşterea cantităţii de AMP_c.

Controlul secreţiei de TSH este efectuat de un tripeptid elaborat de hipotalamus.

10.2.15. HORMONUL ADRENOCORTICOTROP

Funcţia cortexului glandelor suprarenale este reglată şi controlată de un polipeptid care conţine în structura sa 39 de aminoacizi, cu masa de 4 500. Acest polipeptid este secretat de lobul anterior hipofizar şi induce biosinteza de hormoni steroizi, prin trecerea colesterolului în pregnenolon. Semnalele din ambianţă, recepţionate cortical, induc stimuli asupra hipofizei, care va secreta ACTH; acesta, la rîndul său, influenţează sinteza de hormoni corticoizi din suprarenală, ce vor influenţa reacţiile moleculare.

Administrarea de ACTH produce următoarele efecte la omul sănătos:

1) creşterea excreţiei de azot, potasiu, fosfor şi acid uric;
2) retenţie de sodiu, clor şi apă;
3) influenţează glicemia şi acizii graşi liberi din circulaţie;
4) scade numărul de eozinofile şi limfocite.

Se admite că ACTH-ul acţionează în procesele de mai sus atît prin intermediul hormonilor steroizi, cît şi prin inducţia asupra adenilciclazei, cu formare de AMP_c.

Controlul secreţiei de ACTH, ca şi a altor hormoni endocrinotropi secretaţi de hipofiză, este realizat de corticotrofin-releasing-factor (CRF) din hipotalamus prin intermediul celor trei monomeri denumiţi α_1, α_2 şi β. Forma β este asemănătoare ca structură cu vasopresina; aşa se explică faptul că administrarea de vasopresină induce o stimulare a secreţiei de ACTH.

10.2.16. HORMONII GASTROINTESTINALI CU STRUCTURĂ POLIPEPTIDICĂ

Aceştia sînt secretaţi de către mucoasa gastrointestinală; gastrina (17 AA), secretina (27 AA), cholecistokinina (33 AA), motilina (22 AA), enteroglucagonul (29 AA), chemodenina (28 AA) şi buldogastrina (43 AA).

Pe întregul traiect gastrointestinal, de la esofag la rect, se află celule specializate cu rol de secreţie endocrină, capabile de reacţie la stimuli mecanici şi chimici, pentru reglarea procesului de absorbţie. Secreţia internă a intestinului este modulată de sistemul neuroendocrin şi de glan-

Scanned with OKEN Scanner

dele anexe, ca pancreasul exocrin și secreția veziculei biliare. În acest mod, funcția intestinului apare ca o glandă exoendocrină, cu mare capacitate de reglare funcțională, care transmite semnale de reglare și primește la rîndul său semnale de la sistemul nervos central și endocrin, în vederea modulării organismului cu ambianța.

10.2.17. HORMONII STEROIZI

Hormonii steroizi se împart în următoarele clase, după originea lor și mecanismul de acțiune:

A. Corticoizii, secretați de cortexul suprarenal
— glucocorticoizi, cu acțiune în metabolismul glucidelor;
— mineralocorticoizi, cu acțiune în metabolismul mineral;
— sexualocorticoizi, cu acțiune în metabolismul și în sfera sexuală.
B. Hormonii sexuali secretați de glandele sexuale
— androgenoizi;
— estrogeni.

Mecanismul de acțiune al hormonilor steroizi este la nivelul ARN, în sinteza de proteine și enzime. Receptorii specifici pentru hormoni ar putea fi asociați cu părți structurale din ADN, în care caz cromatina are un rol important în acest proces de sinteză. Aceasta denotă că sinteza de ARN, proteine celulare și enzime specifice este dependentă și de acțiunea hormonilor steroizi. Inducția hormonilor în sinteza proteinelor se face în aproximativ 30 de minute, pînă la cîteva ore, fapt ce ar explica unele aspecte terapeutice ale acestor compuși sterolici.

Biosinteza hormonilor steroizi pleacă de la colesterol, care, așa cum am văzut, se sintetizează din acetat activ. Colesterolul, sub acțiunea unor sisteme enzimatice specifice și în funcție de vîrstă, sex și solicitările din ambianță, trece spre hormonii steroizi prin intermediul Δ5-pregnenolonei.

Δ-5 pregnenolona este convertită în progesteronă sub acțiunea unei dehidrogenaze specifice; prin această oxidare gruparea hidroxil de la C_3 este trecută în grupare cetonică. Reacțiile de sinteză se pot vedea din schema alăturată (fig. 78).

Sinteza hormonilor sexuali feminini și masculini, pleacă de la Δ5-pregnenolonă, care prin hidroxilare trece în 17α-hidroxipregnenolonă, după schema următoare (fig. 79).

Acțiunea fiziologică a hormonilor corticosuprarenali, variază în funcție de tipul de hormoni.

Glucocorticoizii conțin la C_{11} o grupare funcțională hidroxil sau cetonică, ca în cortizon și cortisol sau în hidrocortizon. Acești hormoni acționează asupra ARN și a sintezei de enzime specifice în țesuturile și organele cu activitate metabolică inductivă, cum sînt ficatul, rinichiul, glandele endocrine etc. Efectul lor în metabolismul glucidic este antagonist cu al insulinei, ducînd la o creștere a concentrației glucozei sangvine și totodată a acizilor grași liberi și aminoacizilor.

În țesuturile periferice, ca mușchi, țesut adipos și limfoid, glucocorticoizii induc un efect de conservare a glucozei, prin moderarea glicolizei, a sintezei de proteine și favorizarea lipolizei. Unele efecte gluconeogenetice din ficat se datoresc mobilizării trigliceridelor, cu punerea în libertate de

Scanned with OKEN Scanner

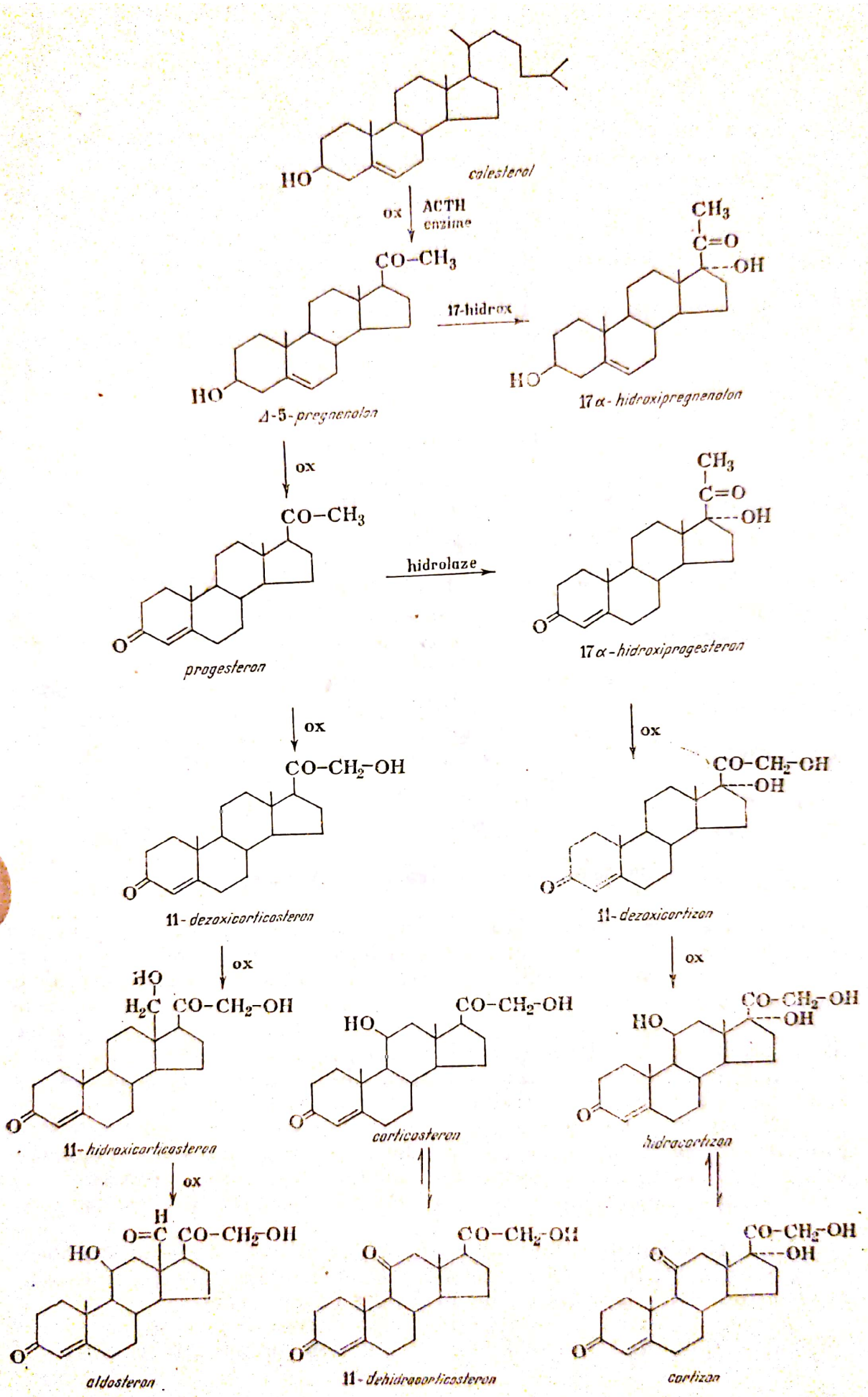


Fig. 78. Biosinteza hormonilor steroizi.

Scanned with OKEN Scanner

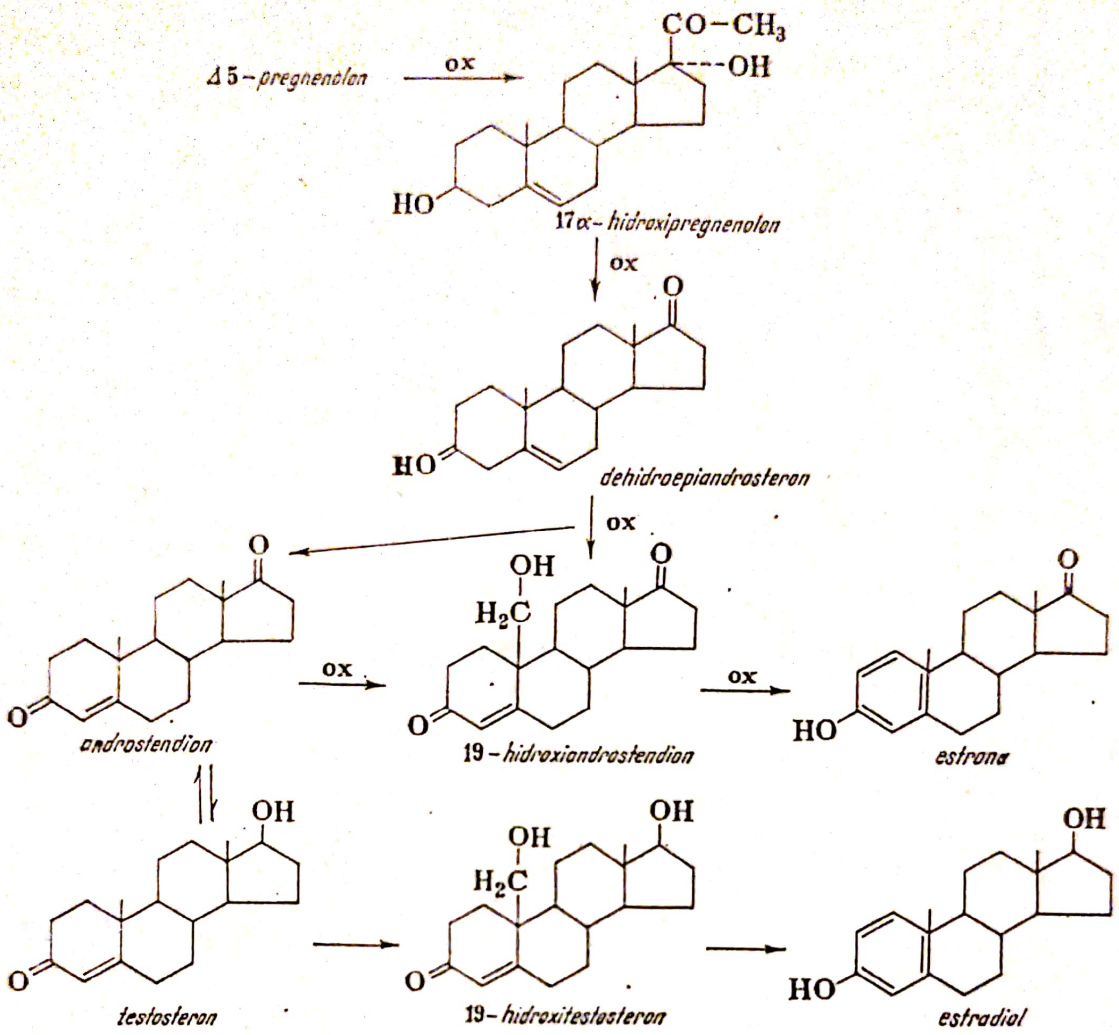


Fig. 79. Sinteza hormonilor sexuali din Δ -5-pregnenolon.

glicerol, şi a activării oxidării unor aminoacizi din proteinele ţesutului muscular periferic. În particular, aceşti hormoni induc creşterea sintezei de enzime la nivelul ficatului. Acestea sînt implicate în mod special în metabolismul unor aminoacizi (ca alanina, acidul glutamic), a unor enzime (ca tirozintransaminaza şi triptofanpirolaza). Unele sisteme enzimatice, direct implicate în reglarea gluconeogenezei, cum sînt : piruvatcarboxilaza, fosfoenolpiruvatcarboxikinaza, fructozo-1,6-difosfataza şi glucozo-6-fosfataza, sînt stimulate în activitatea şi biosinteza lor.

Alte efecte importante a glucocorticoizilor sînt cele antiinflamatorii, imunosupresive, de stimulare a secreţiilor exocrine a stomacului şi pancreasului. Sînt antagoniştii hormonilor medulo-suprarenali, adrenalinei şi noradrenalinei, moderînd tensiunea arterială produsă de *stress*-ul emoţional.

Mineralocorticoizii, hormoni steroizi fără grupare carbonil sau hidroxil în poziţia **11**, induc efecte asupra metabolismului mineral, prin favorizarea absorbţiei de sodiu şi clor la nivelul tubilor renali.

Evident că există diferenţe apreciabile în ceea ce priveşte activitatea lor, aldosterona fiind de 1 000 de ori mai activă comparativ cu cortisolul.

Scanned with OKEN Scanner

Aldosterona acţionează asupra dinamicii ionilor de sodiu, potasiu şi magneziu. Acţiunea exactă a aldosteronei nu este complet lămurită; este posibil să intervină, ca şi alţi corticoizi, prin stimularea sintezei de ARN — care va dirija sinteza de enzime specifice.

Sexual-corticoizii rezultă prin oxidarea glucomineralocorticoizilor, cum sînt dehidroandrosterona şi androstendiona. În cazuri de tumori ale suprarenalei s-a pus în evidenţă şi testosterona.

Efectul acestora, ca şi al hormonilor androgenici, produce retenţia de azot, fosfor, potasiu, sodiu şi clor. Sinteza lor crescută produce la femei apariţia caracterelor sexuale secundare masculine.

10.2.18. HORMONII SEXUALI

Hormonii sexuali feminini sînt secretaţi fie de ovare şi numiţi foliculari sau estrogeni, fie de corpul galben şi se numesc gestogeni, ca progesterona.

Diferă structural de androgenoizii primi prin nucleul aromatic şi lipsa metilului de la C_{10}. Cei mai importanţi sînt estrona sau foliculina şi estradiolul, dintre cei secretaţi de ovare (formulele în schema de reacţii).

Acţiunea fiziologică a estrogenilor se exercită asupra ciclului estral inducînd o serie de schimbări în aparatul sexual feminin pînă la ovulaţie şi hemoragie. Participă la formarea mucoasei uterine în vederea acţiunii ulterioare a progesteronei, în cazul fecundării ovulului.

Este posibil ca estrogenii să acţioneze tot prin intermediul influenţării sintezei de ARN, semnal indus la concentraţii de 10^{-14} M cu sinteză de enzime specifice.

Estrogenii constituie cofactori ai unor transhidrogenaze care catalizează transferul de hidrogen de la NADPH la NAD^+.

Participă la determinarea caracterelor sexuale feminine secundare, la dezvoltarea glandei mamare şi sinteza de lipide.

Progesterona este considerată ca un hormon specific feminin. Apare după ovulaţie, fiind în antagonism cu estrogenii. Acest hormon stimulează maturaţia glandelor mamare şi secreţia de lapte.

Hormonii sexuali masculini, dintre care principalul este testosterona, se sintetizează în celulele interstiţiale (L e y d i g) din testicule. Aşa cum se poate vedea din schema de producere a hormonilor sexuali, intermediari în sinteza de testosteron sînt **17**-hidroxipregnenolona şi androstendiona, care provin din pregnenolon.

Între prehormoni şi hormonii propriu-zişi se realizează un echilibru dinamic care este condiţionat de vîrstă, activitate şi informaţia genetică.

Acţiunea testosteronei şi androsteronei este de inducţie a sintezei de ARN în cromatina nucleară şi a sintezei proteinelor specifice cu activitate enzimatică.

Administrarea androgenilor favorizează sinteza de proteine prin creşterea concentraţiei de ARN şi ARN-polimerază în nucleu, odată cu creşterea activităţii aminoaciltransferazei ribozomale.

Este posibil ca androgenii să acţioneze şi prin activarea unor sisteme enzimatice glicolitice de tipul hexokinazelor. Androgenii intervin şi la

Scanned with OKEN Scanner

nivelul mitocondriilor, stimulînd reacţiile redox cu formarea de compuşi macroergici de tipul ATP şi GTP.

Sinteza hormonilor sexuali feminini şi masculini, care diferenţiază cele două sexe, este sub controlul hipofizei anterioare. De reţinut este intervenţia lor în reacţiile moleculare celulare, începînd cu cele de sinteză a compuşilor din structura organismului şi terminînd cu modularea stării psihocomportamentale a biosistemului.

Schema de interrelaţii dintre hormonii rezultaţi din cortexul suprarenal, corpul galben, ovar şi testicul dă o imagine a modulării sintezei de colesterol plecînd de la acetat, de la colesterol la prehormoni şi hormoni corticoizi (fig. 80).

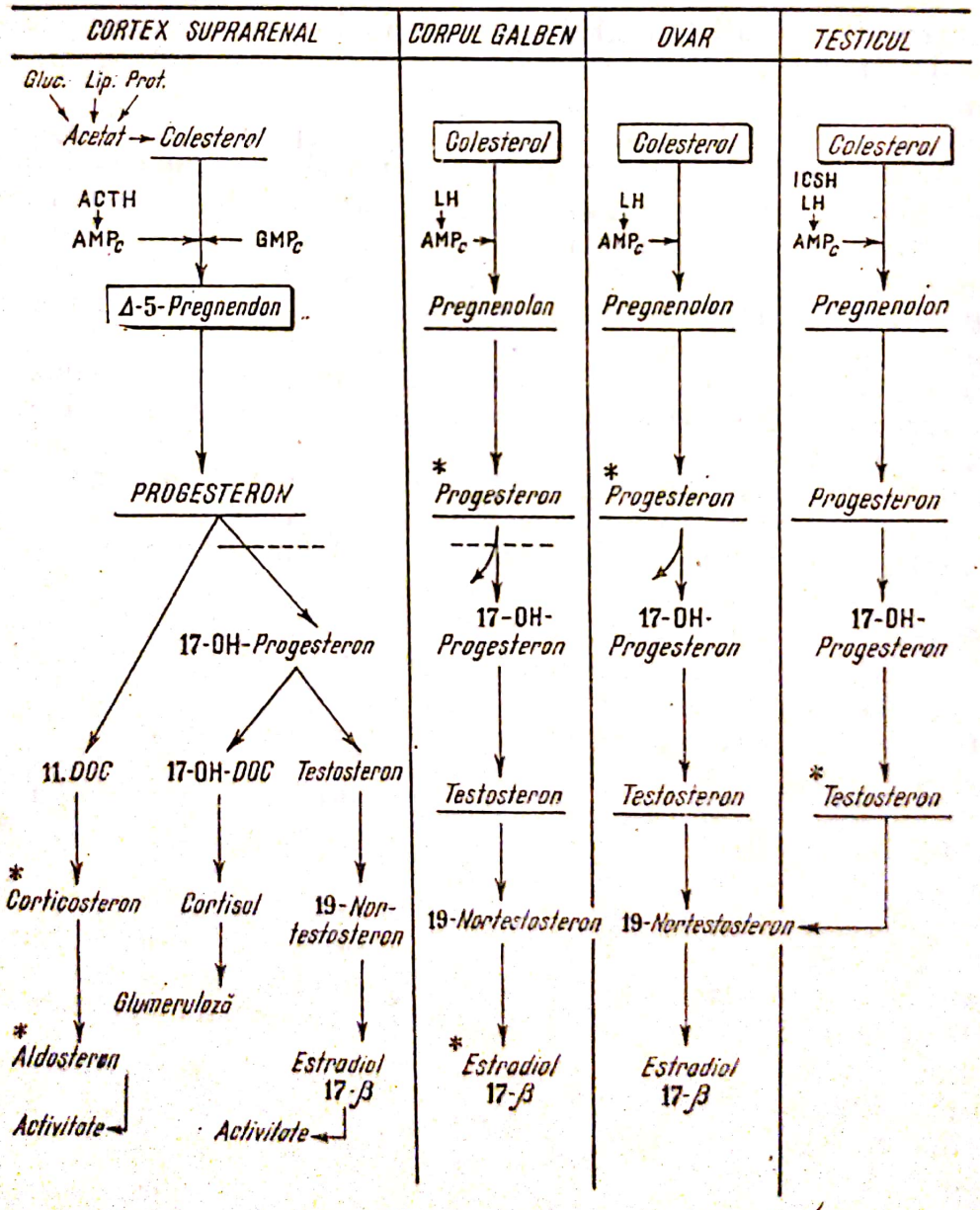


Fig. 80. Sinteza hormonilor steroizi plecînd de la acetatul activ.

Scanned with OKEN Scanner

10.3. BIORITMURILE

Semnalele luminoase din radiaţia solară cuprinse între 380 nm la 770 nm, care constituie spectrul vizibil, sînt codificate în organismele vegetale în informaţii chimice, în cadrul reacţiilor moleculare, a compuşilor organici rezultaţi în procesul de fotosinteză.

Comportarea bioritmică a funcţiilor din organisme este dependentă de unele din formaţiunile structurale ale acestora, dintre care cea mai bine studiată pînă în prezent este glanda pineală. Această formaţiune are rol de transductor neurochimic, între stimulii luminoşi, informaţia nervoasă şi organe, în cadrul bioritmurilor circadiene. Din punct de vedere anatomic, glanda pineală se află între cele două emisfere cerebrale şi are greutatea de 100 mg la om şi de 1 mg la şobolan.

Mesagerul chimic elaborat de pineală este numit melatonină. Structural, melatonina derivă din triptofan fiind 5-metoxi-N-acetiltriptamină. Melatonina este cel mai activ compus cunoscut care produce contracţia celulelor melanofore din pielea de broască şi peşti. O soluţie de melatonină de concentraţia 10^{-9}M aplicată pe pielea amfibiilor produce schimbarea culorii acestora. La mamifere, melatonina secretată de pineală are efecte asupra sferei gonadice, interferînd cu hormonii gonadotropi, în stimularea şi inhibarea lor.

Biosinteza melatoninei se face exclusiv în glanda pineală, fiind dependentă, pe lîngă stimulii luminoşi, şi de sistemele enzimatice specifice. Reacţiile de sinteză a melatoninei sînt date la 10.2.3.

Sinteza este controlată de catecholamine, prin intermediul adenilciclazei din glanda pineală şi a unei proteinkinaze. Reacţia limitantă de viteză este cea de formare de N-acetilserotoninei. Integritatea retinei şi a stimulului luminos sînt absolut necesare pentru transmiterea semnalului la sistemul enzimatic din glandă. Într-o serie de experienţe făcute pe amfibii, păsări şi animale, privind atît comportarea unor funcţii, cît şi a unor bioritmuri circadiene, s-a demonstrat că informaţia se transmite prin următoarele conexiuni :

Impuls luminos $\xrightarrow{h\nu}$ retină → tractul optic inferior → conexiuni mediene din creierul anterior → conexiuni terminale din nucleii accesori şi sistemul optic → tractul preganglionar simpatic → parenchimul celulelor glandei pineale → informaţie din ambianţă, cu localizare spaţială temporală.

10.3.1. REGLAREA RITMURILOR CIRCADIENE DE CĂTRE GLANDA PINEALĂ

O serie de secreţii şi procese funcţionale se petrec ritmic în decursul a 24 de ore, a unei săptămîni, luni şi anual. Amintim printre acestea secreţiile de suc gastric, pancreatic, suc intestinal şi biliar, sinteza şi elaborarea în circulaţie a hormonilor steroizi, a unor enzime, sinteza elementelor sangvine, ciclul estral şi hibernarea etc. Comportarea ritmică a acestora, cît şi a altor procese, este modulată şi dirijată de ceasornicul organismului, care este glanda pineală, prin hormonul melatonină. Alături de melatonină participă N-acetiltransferaza, serotonina şi N-acetilserotonina, pre-

Scanned with OKEN Scanner

cursori ai hormonului. Pe lîngă compuşii direct intricaţi în sinteza din glanda pineală, în activitatea sa ritmică diurnă şi nocturnă, mai este influenţată de sistemul nervos simpatic prin noradrenalină şi adrenalină. Administrarea de catecholamine în timpul zilei, cînd activitatea N-acetiltransferazei şi N-acetilserotonina sînt scăzute, iar serotonina crescută, duce la o activare a enzimelor, cu schimbarea concentraţiei în produşi finali. Aceasta demonstrează că ritmul circadian dirijat de glanda pineală este sub dependenţa enzimelor specifice, ca N-acetiltransferaza, care la rîndul său depinde de receptorii beta-adrenergici şi care, la rîndul lor, sînt în relaţie continuă cu stimulii pozitivi şi negativi din ambianţă.

Acţiunea luminii asupra retinei apare ca un modulator de reacţie, care îşi exercită acţiunea stimulatoare sau inhibitoare prin intermediul neurotransmiţătorilor influenţaţi de sistemul nervos simpatic din pineală. Relaţia de modulare este dependentă pe lîngă sistemul adrenergic, de intervenţia AMP_c şi GMP_c — care, la rîndul lor, induc semnale asupra adenil- şi guanilciclazelor, enzime de sincronizare de relaţii între energie şi informaţie, între biosistem şi ambianţă. Relaţia dintre concentraţiile AMP_c şi GMP_c este determinată în sensul reacţiilor de modulare circadiene.

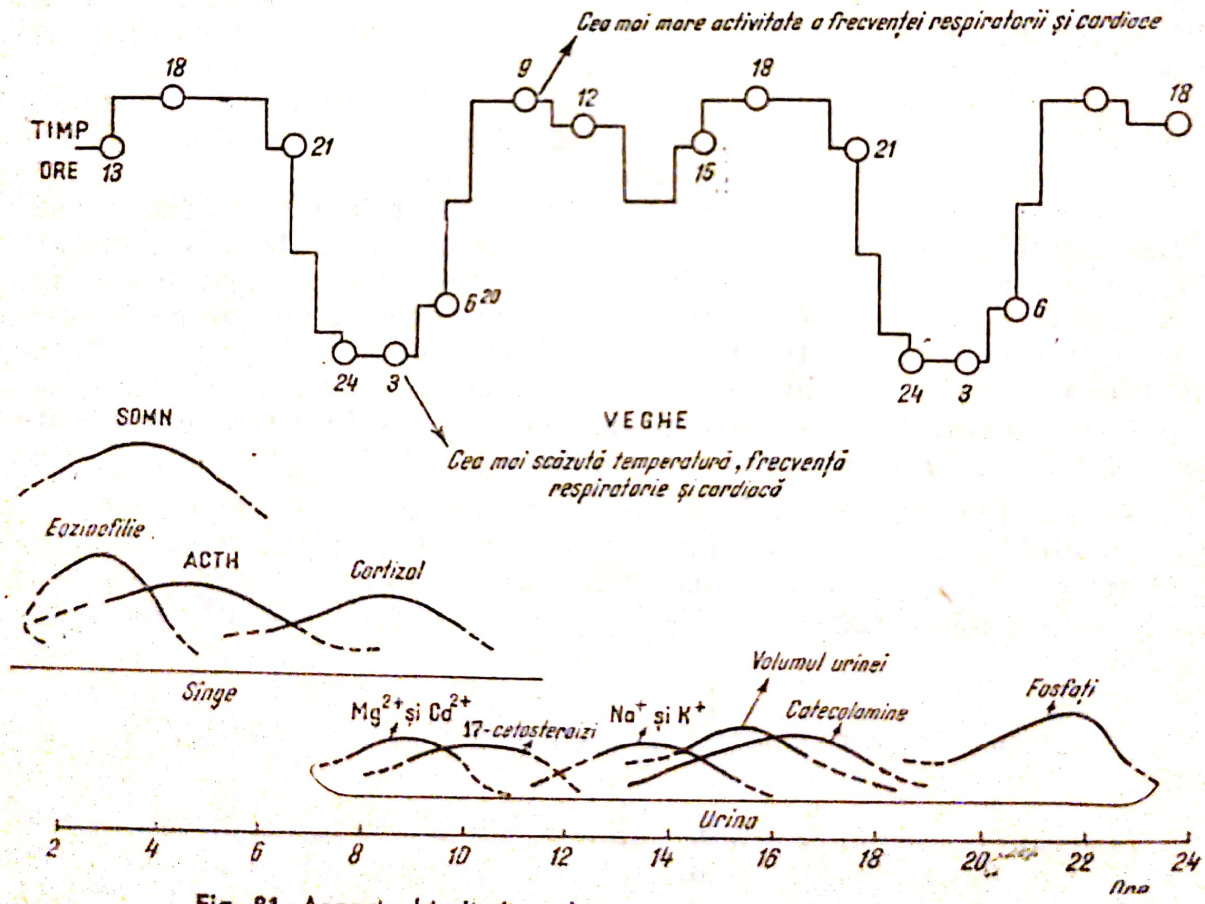


Fig. 81. Aspecte bioritmice ale unor compuşi din sînge şi urină.

Din figura 81 se pot aprecia cîteva din funcţiile biologice dependente de bioritmul circadian. Evident lucru că bioritmurile sînt în modulare molecular-funcţională cu multe alte aspecte din biosistem, în cele de mai sus fiind redate doar aspectele şi noţiunile generale ale fenomenului.

Scanned with OKEN Scanner

CRONOLOGIA UNOR DESCOPERIRI IMPORTANTE ÎN BIOCHIMIE

1773 — Descoperirea ureei (Rouelle)
1779 — Prepararea glicerolului din ulei de măsline (Scheele)
1783 — Descoperirea digestiei extracelulare a proteinelor (Spallanzani)
1789 — Respirația — proces de oxidare (Lavoisier)
1815 — Elucidarea reacției generale a fermentației alcoolice (Gay-Lussac)
1815 — Descoperirea activității optice (Biot)
1828 — Sinteza ureei din izocianatul de amoniu — prima sinteză a unui compus organic existent în organismul viu (Wöhler)
1837 — Studiul hidrolizei enzimatice a amigdalinei cu emulsie de migdale (Liebig, Wöhler)
1836–1839 — Fermentația — proces catalitic (Berzelius, Liebig)
1857 — Fermentația — proces depinzînd esențial de celula vie (Pasteur)
1863 — Rolul fosfaților în agricultură (Liebig)
1869 — Descoperirea acizilor nucleici (Miescher)
1885 — Descoperirea spectroscopică a citocromilor (MacMunn)
1890 — Prima proteină cristalizată: albumina de ou (Hofmeister)
1893 — Clasificarea enzimelor drept catalizatori, din punct de vedere al chimiei fizice (Ostwald)
1897 — Descoperirea fermentației acelulare (E. și H. Büchner)
1902 — Formularea polipeptidică a proteinelor (Hofmeister, E. Fischer)
1903 — Izolarea primului hormon: epinefrina (Takamine, Aldrich)
1905 — Rolul acidului fosforic în fermentație (Harden, Young)
1905 — Descoperirea β-oxidării (Knoop)
1912 — Teoria dehidrogenării în oxidările biologice (Wieland)
1922 — Izoprenul — principiu de construcție a numeroși produși naturali (Ruzicka)
1925 — Formularea piranozică a glucidelor (Haworth)
1926 — Izolarea tiaminei (Jansen, Dinath)
1926 — Prima enzimă cristalizată: ureaza (Summer)
1925 — Determinarea maselor moleculare ale proteinelor prin ultracentrifugare (Svedberg)
1929 — Descoperirea fosfaților labili: ATP (Lohmann, Fiske, Subarrow)
1929–1934 — Izolarea unor hormoni steroizi (Butenandt, Doisy, Laqueur, Reichstein)
1931 — Introducerea noțiunii de *lezlune biochimică* (Gavrilescu-Peters)

Scanned with OKEN Scanner

1932 — Descoperirea fermentului galben (Warburg, Theorell)
1933 — Noi scheme ale glicolizei și fermentației alcoolice (Embden-Meyerhof)
1935 — Descoperirea legăturii dintre vitamine și coenzime (Euler, Theorell, Warburg i)
1936 — Izolarea NAD^+ și FAD (von Euler)
1935 — Izolarea primului virus cristalizat : virusul mozaicului tutunului (Stanley)
1937 — Formularea ciclului acidului citric (Krebs, Knoop, Martius, Szent-Györgyi)
1938 — Descoperirea transaminării (Braunstein, Kritzmann)
1939 — Izolarea și determinarea structurii primului antibiotic : penicilina (Fleming, Florey, Chain, Johnson)
1944 — Mecanismul de acțiune al factorilor genetici prin enzime (Butenandt, Kühn)
1944 — Izolarea transformării factorului pneumococic și caracterizarea lui ca ADN (Avery)
1951 — Elucidarea rolului acetatului activ (Lipman, Lynen)
1952 — Elucidarea structurii mitocondriei (Palade, Lehninger)
1952 — Structura helicoidală a proteinelor (Pauling)
1953 — Determinarea structurii insulinei (Sanger)
1953 — Descoperirea ciclului pentozofosfatului în catabolismul glucozei (Horecker, Dickens)
1954 — Modelul ADN (Watson, Crick)
1958 — Descoperirea infectivității acizilor nucleici virali (Gierer, Schramm)
1958 — Izopentenilpirofosfatul ca izopren activ (Lynen)
1961 — Descoperirea codului genetic (Nierenberg, Ochoa)
1964 — Calea de activare a acetatului în biosinteza de sterine, terpene și acizi grași (Lynen)
1969 — Sinteza în laborator a primei enzime : *ribonucleaza* (Merrifield, Gutte)
1970 — Sinteza în laborator a unei gene din drojdie (Khorana)
1970 — Reverstranscriptaza (Dulbecco, Temin, Baltimore)
1971 — Sisteme multienzimatice în reglarea metabolismului intermediar (Lynen, Stadman)
1974 — Dirijarea genetică (Chang, Chen)

Scanned with OKEN Scanner

BIBLIOGRAFIE

1. Baciu, I.: *Cum funcționează creierul*: Editura Dacia, Cluj, 1974.
2. Barbu, R.: *Fiziopatologie*: Editura didactică și pedagogică, București, 1975.
3. Bittar, E. and Bittar, N.: *The Biological Basis of Medicine*: Vol. 1—6, Acad. Press, London, 1969.
4. Bohinski, R. C.: *Modern Concepts in Biochemistry*: Allyn and Bacon, Inc., Boston, 1974.
5. Bray, H. G. and White, K.: *Kinetics and Thermodynamics in Biochemistry*: I.A. Churchill, Ltd., London, 1957.
6. Căpâlna, S.: *Biochimie dinamică*, Editura medicală, București, 1971.
7. Colowick, S. P. and Kaplan, N. O.; *Methods in Enzymology*, vol. 1—28, Acad. Press, New York-London, 1958—1972.
8. Dumitru, F., Mager, S. și Turcu, A.: *Biochimie generală*, Editura didactică și pedagogică, București, 1973.
9. Flaschenträger, B. und Lehnhartz, E.; *Phisiologische Chemie*, vol. 1—4, Springer Verlag, Berlin, 1952—1957.
10. Florkin, M. and Stotz, E. H.: *Comprehensive Biochemistry*, vol. 1—18, Elsevier, Amsterdam, 1962—1970.
11. Groza, P.: *Fiziologie*, Editura medicală, București, 1974.
12. Harper, H. A.: *Physiological Chemistry*, Lange, Med. Pub., Los Altos—California, 1975.
13. Horecker, B. L. and Stadtman, R.: *Curent Topics in Cellular Regulation*, vol. 1—9, Acad. Press, New York—London, 1969—1975.
14. Jones, R. W.: *Principles of Biological Regulation*, Acad. Press, New York, 1973.
15. Karlson, P.: *Kurzer Lerbuch der Biochemie*, G. Thieme, Stuttgart, 1961.
16. Lehninger, A. L: *Biochemistry*, Second Edition, Worth Pub., New-York, 1975.
17. Lemberg, R, and Barett, I.: *Cytochromes*, Acad. Press, London, 1973.
18. Long, C.: *Biochemists' Handbook*, E & F Spon Ltd., London, 1961.
19. Lynen, F.: *Biochemische Strukturen in der lebendigen Substanz*, Jahrbuch 1969 der Max—Planck—Gesellschaft, München, 1969.

Scanned with OKEN Scanner

20. Mahler, H. R. and Cordes, E. H.: *Biological Chemistry*, Harper Internal, New York, 1966.
21. Mallete, M. F., Clagett, C. O., Phillips, A. T. and McCarl, R. C.: *Introductory Biochemistry*, Williams and Wikins Comp., Baltimore, 1971.
22. Pullman, B.: *Electronic Aspects of Biochemistry*, Acad. Press, New York, 1964.
23. Racker, E.: *Structure and Function of ATP-driven Ion Pumps*, Trends in Biochemical Science, 1, 244, 1976.
24. Rauen, H. M.: *Biochemisches Taschenbuch*, vol. 1—2, Springer, Berlin, 1964.
25. Silman, I. : *Molecular Structure of Acetylcolinesterase*, Trends in Biochemical Science, 1, 225, 1976.
26. Stryer, L.: *Biochemistry*, W. H. Freeman, Comp. San Francisco, 1975.
27. White, A., Handler, P. and Smith, E. L.: *Biochemistry*, Fifth Edition Ed. McGraw-Hill, New York, 1973.

Scanned with OKEN Scanner

Plan editură: 5517/77 Tiraj 13.200+80 ex. legate
Coli de tipar: 22.5 Bun de tipar 20.XI 1977
Apărut 1977

C. 225. — I. P. INFORMAŢIA
str. Brezoianu nr. 23—25
Bucureşti

Scanned with OKEN Scanner